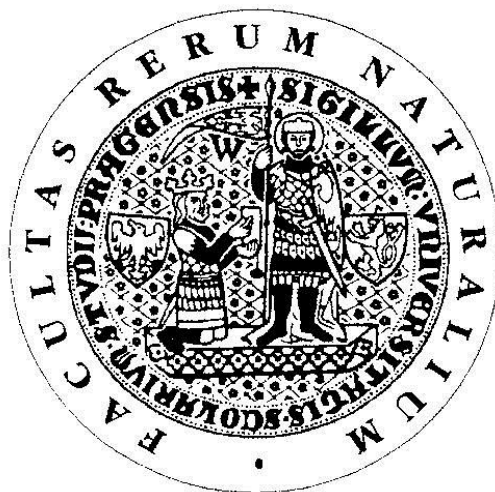


Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

studijní program: Klinická a toxikologická analýza



Bc. Nikola Böerová

Rekombinantní produkce bovinních NK receptorů

Recombinant production of bovine NK cell receptors

Diplomová práce

Praha 2012

Rekombinantní produkce bovinních NK receptorů

Vypracovala: Bc. Nikola Böerová

Vedoucí diplomové práce: Mgr. Daniel Kavan Ph.D.

Vypracováno v:

Mikrobiologickém ústavu AV ČR

Sektor imunologie a gnotobiologie

Laboratoř přirozené imunity

Tato diplomová práce vznikla v souvislosti s řešením výzkumného záměru MSM0021620857 a MSM0021620808.

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto závěrečnou práci zpracovala samostatně pod vedením Mgr. Daniela Kavana, Ph.D. a Prof. RNDr. Karla Bezoušky, DSc. a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

Jsem si vědoma toho, že případné využití výsledků získaných v této práci mimo Univerzitu Karlovu v Praze a Mikrobiologický ústav AV ČR je možné pouze po písemném souhlasu těchto institucí.

V Praze dne

.....

Nikola Böerová

Poděkování

Chtěla bych velmi poděkovat vedoucímu své diplomové práce Mgr. Danielu Kavanovi Ph.D. za skvělé odborné vedení, důležité a věcné rady a velkou dávku trpělivosti při řešení komplikací. Ráda bych také poděkovala Prof. RNDr. Karlu Bezouškovi, DSc. za cenné odborné konzultace a za umožnění vypracování diplomové práce.

Dále bych také poděkovala všem členům laboratoře za vytvoření příjemného pracovního prostředí a vyplnění chvil mezi experimenty poskytnutím drahocenných rad. Velké díky patří celé mé rodině, která při mně stála po celou dobu studií a poskytovala mi tak morální oporu a značné finanční prostředky.

Obsah

1	Úvod	12
1.1	Imunitní systém.....	12
1.2	Leukocyty.....	13
1.3	MHC glykoproteiny.....	14
1.4	NK buňky	15
1.5	Receptory NK buněk	17
1.6	Bovinní NK receptory.....	19
1.6.1	CD69.....	20
1.6.2	NKR-P1	20
1.6.3	NKG2D.....	20
2	Cíl práce	21
3	Materiál.....	22
3.1	Chemikálie	23
3.2	Enzymy	24
3.3	Vektory.....	25
3.4	Bakterie	25
3.5	Oligonukleotidy.....	25
3.6	Roztoky.....	26
3.7	Média	27
4	Metody.....	28
4.1	Příprava konstruktů.....	28
4.1.1	PCR.....	28
4.1.2	Agarosová elektroforéza	28
4.1.3	Oligonukleotidově řízená mutagenese.....	29
4.1.4	Restrikce DpnI.....	29
4.2	Příprava proteinu	30
4.2.1	Transformace do bakteriálních buněk.....	30

4.2.2	Selekce produkčního klonu	30
4.2.3	SDS PAGE.....	30
4.2.4	Optimalizace produkce	31
4.2.5	Velkoobjemová produkce	31
4.2.6	Izolace inkluzí	32
4.2.7	Renaturace	32
4.2.8	Gelová filtrace	32
4.2.9	Stanovení koncentrace	33
4.3	Identifikace	34
4.3.1	Elektropřenos na PVDF membránu	34
4.3.2	Identifikace proteinu metodou peptidového mapování	34
5	Výsledky.....	35
5.1	bCD69	35
5.1.1	Produkce v bakteriálních buňkách	35
5.1.2	Identifikace proteinu bCD69	36
5.1.3	Optimalizace produkce	37
5.1.4	Velkoprodukce.....	38
5.1.5	Renaturace	38
5.1.6	Stanovení koncentrace dle Bradfordové	42
5.1.7	Stanovení koncentrace za použití BCA	42
5.2	bNKRP1	43
5.2.1	PCR.....	43
5.3	bNKG2D	44
5.3.1	Oligonukleotidově řízená mutagenese.....	44
5.3.2	Produkce v bakteriálních buňkách	44
6	Diskuze.....	47
7	Citovaná literatura	51

Seznam zkratek a symbolů

AcN	acetonitril
APC	buňky prezentující antigen (Antigen Presenting Cells)
APS	peroxodisíran amonný (Amonium PerSulfate)
ATB	antibiotika
BCA	bicinchoniová kyselina (BicinChoninic Acid)
bp	počet párů bází, jednotka délky řetězce DNA
BSA	hovězí sérový albumin (Bovine Serum Albumine)
CBB R-250	barva Coomassie Brilliant Blue R-250
CD	označení povrchových molekul leukocytů (Cluster of Differentiation)
CRD	lektinová doména vázající sacharid (Carbohydrate-Recognition Domain)
DAP10/12	DNAX-aktivující protein 10/12kDa (DNAX-Activating Protein of 10/12kDa)
DMSO	dimethylsulfoxid
dNTP	směs deoxyribonukleotidtrifosfátů
DTT	dithiothreitol
Fc	fragment imunoglobulinu po štěpení papainem (Fragment, Crystallizable)
FcγRIII	receptor III pro Fc část IgG
FcεRIγ	receptor pro Fc část IgE, vysoká afinita I, gamma polypeptid
HLA	hlavní histokompatibilní lidský antigen (Human Leukocyte Antigen)
IFN	interferon
Ig	imunoglobulin
IL	interleukin
IPTG	isopropyl-β-D-thiogalaktopyranosid
ITAM	aktivační motiv imunoreceptorů založený na tyrosinu (Immunoreceptor Tyrosin-based Activation Motif)
ITIM	inhibiční motiv imunoreceptorů založený na tyrosinu (Immunoreceptor Tyrosin-based Inhibition Motif)
KIR	zabíječský receptor imunoglobulinového typu (Killer Ig-like Receptor)
LB	název média (Luria-Bertani)
LRC	komplex genů leukocytárních receptorů (Leukocyte-Receptor Complex)

MALDI	desorpce/ionizace laserem za účasti matrice (M atrix A ssisted L aser D esorption Ionization)
MHC	hlavní histokompatibilní komplex (M ajor H istocompatibility C omplex)
NK	přirozený zabíječ (N atural K iller)
NKC	genový komplex přirozených zabíječů (N atural K iller C omplex)
NKG2	skupina receptorů zabíječských buněk 2 (N atural K iller G roup 2)
NKR-P1	označení povrchového receptoru NK buněk (N atural K iller R eceptor- P rotein 1)
PAGE	elektroforéza v polyakrylamidovém gelu (P oly A krylamide G el E lectroforesis)
PCR	polymerasová řetězová reakce (P olymerase C hain R eaction)
PMSF	fenylmethylsulfonylfluorid
PVDF	polyvinylidendifluorid
RNA	ribonukleová kyselina
SDS	dodecylsulfát sodný (S odium D odecyl S ulfate)
SHIP	inositol polyfosfát 5' fosfatasa obsahující SH2 doménu (S H2-Domain C ontaining I nositol P olyphosphate 5' P hosphatase)
SHP	tyrosinová fosfatasa obsahující SH2 doménu (S H2-Domain-Containing T yrosin P hosphatase)
Syk	protein-tyrosin kinasa (S pleen T yrosine K inase)
T_c	cytotoxický T lymfocyt (C ytotoxic T cell)
TCR	antigenní receptor T lymfocytů (T C ell R eceptor)
TEMED	N,N,N',N'-tetramethylethyldiamin
TFA	trifluoroctová kyselina
T_H	pomocné T lymfocyty (H elper T C ell)
TOF	doba letu částice (T ime O f F light)
Tris	tris(hydroxymethyl)aminomethan
ZAP-70	protein-tyrosin kinasa asociovaná se zeta řetězcem (Z eta-chain- A ssociated P rotein kinase 70)

Klíčová slova

CD69

NKR-P1

NKG2D

NK receptory

tuř domácí

produkce

Keywords

CD69

NKR-P1

NKG2D

NK receptors

cattle

production

Abstrakt

NK buňky, které jsou součástí vrozeného imunitního systému, získávají stále větší pozornost, zejména kvůli svým schopnostem cytotoxicky zabíjet buňky některých nádorových linií a při určitých virových, bakteriálních či parazitárních napadeních organismu. NK buňky byly objeveny již v 70. letech 20. století a hrají důležitou roli při orgánových transplantacích, v boji s HIV a s jinými autoimunitními onemocněními. S okolím komunikují prostřednictvím svých receptorů, které zejména rozpoznávají nedostatečnou expresi MHC I glykoproteinů na povrchu cílových buněk, čímž se buňky brání rozpoznání cytotoxickými lymfocyty. Dodnes u některých z těchto receptorů nebyla rozřešena prostorová struktura, fyziologický ligand či jejich přesná role v organismu.

Tato diplomová práce se zabývá výzkumem receptorů pocházejících z tura domácího (*Bos taurus*), který nepatří mezi klasická laboratorní zvířata a mým úkolem bylo přispět do výzkumu této skupiny proteinů. Zabývala jsem se jedněmi z nejdůležitějších zástupců NK receptorů a to CD69, NKRP1 a NKG2D získaných rekombinantní produkcí v bakteriálních buňkách.

Výsledky publikované v této diplomové práci navazují na mou bakalářskou práci a společně tak mohou být přínosem pro další strukturní výzkum proteinů a tím v budoucnu mohou pomoci např. ve veterinární medicíně.

Abstract

NK cells, which are part of the innate immune system, are increasingly gaining attention, especially due to their cytotoxic ability to kill tumor cells of certain lines and certain viral, bacterial or parasitic infestation of the body. They lay a role in organ transplantation, the fight against HIV and other autoimmune diseases. NK cells have been studied since the 70th of the 20th century, but the structures and physiological ligands of their receptors remain only partially understood, as does the exact role of these cells in the organism. They communicate with others through their receptors, that recognize the lack of expression of MHC class I glycoproteins on the surface of target cells, thereby preventing cell recognition by cytotoxic lymphocytes.

This diploma thesis deals with the research of receptors from cattle (*Bos taurus*), which is not a traditional laboratory animal and my task was to contribute to research of the structure of this group of proteins. I dealt with the recombinant production of some of the most important representatives of NK receptors CD69, NKRP1 and NKG2D in bacterial cells.

The findings published in this thesis are a continuation of my bachelor thesis and together can be beneficial for further research into structural proteins and thus may help as in veterinary medicine in the future.

1 Úvod

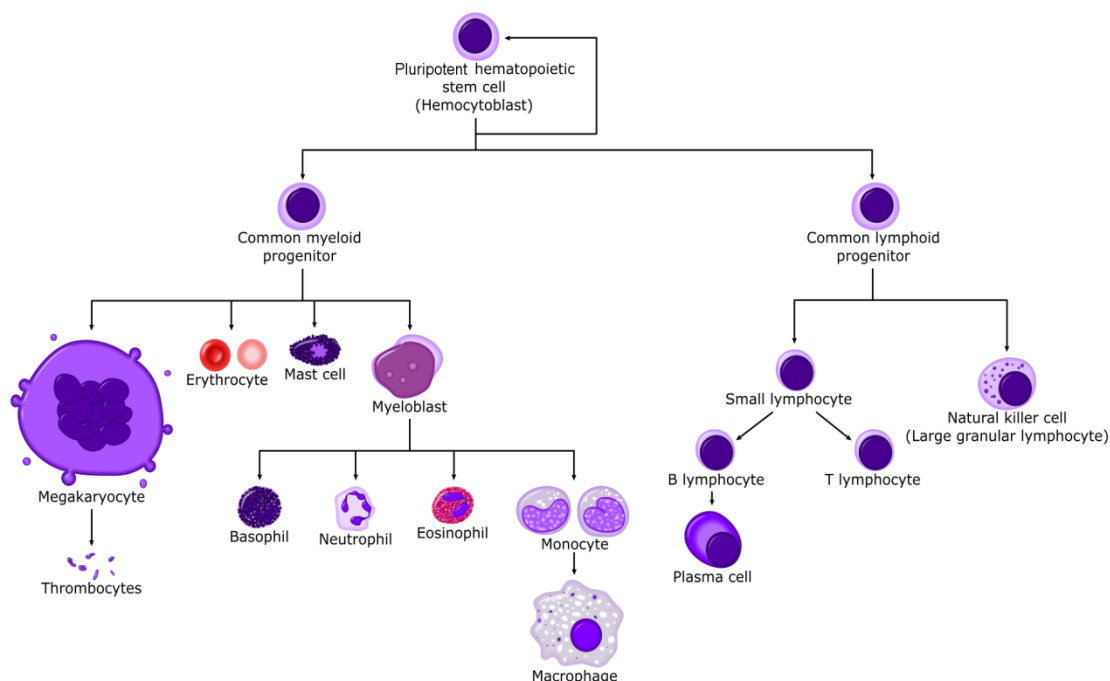
1.1 Imunitní systém

Imunitní systém je systém biologických struktur a procesů v organismu, jenž chrání před onemocněním. Pro správnou funkci organismu musí imunitní systém rozpoznávat širokou škálu látek, virů, bakterií a jiných xenobiotik. Je potřeba rozeznat biologické struktury cizorodé, tělu vlastní a rozlišit tkáně zdravé a nemocné či jinak poškozené. Patogeny jsou schopny se rychle vyvíjet, přizpůsobovat či mutovat, i proto je nutná včasná ochrana a imunitní systém si tak vytvořil celou řadu ochranných mechanismů jak organismus chránit před působením nebezpečných struktur. Důležité je také škodliviny včas a správně rozpoznat a eliminovat je. Detekce se uskutečňuje na základě rozpoznávání antigenů imunitním systémem. Antigenem může být jakákoliv chemická struktura, nejčastěji to jsou polysacharidy nebo proteiny. Aby na ni imunitní systém reagoval, je potřeba, aby byla v makromolekulární rozpustné formě anebo se vyskytovala na buněčném povrchu tzv. antigen prezentující buňky (APC). [1]

U organismů se časem vyvinulo několik vrstev ochrany. Vrozená imunita je evolučně starší, nachází se u všech rostlin i živočichů a poskytuje okamžitou, ale nespecifickou odpověď zajišťovanou fagocytujícími buňkami a přirozeně cytotoxickými buňkami (NK buňky). Pokud by se patogeny vyhnuly nespecifické reakci, obratlovci mají další vrstvu ochrany, kterou je adaptivní imunita. [2] Tato imunita je antigenně specifická a je zprostředkovávána přes specifické molekuly (protilátky a antigenně specifické receptory T lymfocytů). Tyto složky imunity se aktivují až po prvním setkání s konkrétním antigenem, což znamená, že vytvoření specifické imunitní odpovědi na daný antigen trvá několik dní až týdnů. Specifická je pak pro ně tzv. imunologická paměť, kdy imunologická odpověď s již jednou známým antigenem je rychlejší než bez předchozí prvotní aktivace. Obě složky imunity jsou pro organismus nepostradatelné a vzájemně spolupracují. [3] [4]

1.2 Leukocyty

Prostřednictvím různých druhů buněk a molekul jsou zajišťovány imunitní reakce. Bílé krvinky (leukocyty), které vznikají z pluripotentních kmenových buněk přítomných v kostní dřeni, tak tvoří podstatnou část imunitního systému (Obr. 1). Charakteristickým znakem kmenových buněk je přítomnost adhezivní molekuly CD34 a vlivem různých faktorů se mohou diferencovat do lymfoidní anebo myeloidní linie, která je základem nespecifické imunity. [1]



Obr. 1 Diferenciace kmenové buňky [5]

Z myeloidní řady vznikají monocyty, které kolují v krvi a v tkáni se diferencují na makrofágy a granulocyty, z kterých vznikají neutrofily, eozinofily a bazofily, jejichž tkáňovou formou jsou žírné buňky. Do této řady patří i dendritické buňky. Většina buněk z této linie je schopna fagocytózy, produkují cytokiny a působí jako velmi důležité APC pro T-lymfocyty, čímž jsou součástí i antigenně specifické imunity. T-lymfocyty patří společně s B-lymfocyty a NK buňkami do lymfoidní linie. B-lymfocyty se vyvíjejí v kostní dřeni, odkud putují do sekundárních lymfoidních orgánů, jako jsou lymfatické uzliny a slezina, kde se jejich vývoj ukončuje po setkání s antigenem a stávají se z nich plazmatické buňky produkující protilátky. Oproti tomu hlavní vývoj T-lymfocytů se uskutečňuje v brzlíku, kde se diferencují na dvě fenotypicky odlišné

subpopulace a to prekurzory pomocných T_H buněk nesoucí na svém povrchu receptor CD4 a zodpovědné za produkci řady cytokinů regulující ostatní buňky a prekurzory cytotoxických T_C buněk, které nesou receptor CD8. Tyto prekurzory se po setkání s antigenem mění na zralé efektorové buňky nebo část z nich tvoří tzv. imunologickou paměť zodpovědnou za sekundární odpověď, která je rychlejší a efektivnější než primární imunitní odpověď. Během diferenciací T a B-lymfocytů dochází k přeskupování genů kódujících variabilní úseky jejich antigenně specifických receptorů, vzniká tak velké množství klonů, jejichž vývoj se ukončí až po setkání se specifickým antigenem. [6] [7]

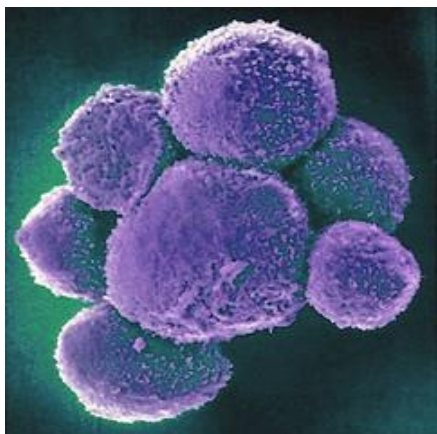
1.3 MHC glykoproteiny

Mezi základní molekuly imunitního systému patří MHC glykoproteiny, u lidí označované jako HLA molekuly. MHC glykoproteiny I. třídy vážou peptidové fragmenty buňkou produkováných proteinů a vystavují je na všech jaderných buňkách. MHC glykoproteiny II. třídy se vyskytují pouze na APC a prezentují peptidové fragmenty buňkou pohlcených proteinů. Tyto peptidové fragmenty jsou následně rozpoznávány specifickými receptory imunitních buněk. [1]

Přestože patří MHC glykoproteiny do imunoglobulinové superrodiny, vyskytují se v jejich částech nejvíce vzdálených od plasmatické membrány dva atypické α -helixy tvořící vlastní místo pro vazbu antigenu. U MHC glykoproteinů I. třídy je dutina ohraničená dvěma α -helixy uzavřená, a umožňuje tak navázat antigenní peptidy o délce do 8 aminokyselin. K vazbě těchto antigenních peptidů dochází již v endoplasmatickém retikulu, přes membránu retikula se peptidy dostávají z cytoplasmy prostřednictvím speciálních peptidových přenašečů. U MHC glykoproteinů I. třídy nejsou oba ohraničující α -helixy v bezprostředním kontaktu, což umožňuje vazbu až několikanásobně delších peptidů. Tyto delší peptidové antigenní fragmenty se navazují později (v endosomech) a to výměnou za dočasný stabilizační polypeptid, tzv. invariantní řetězec.“ [8]

1.4 NK buňky

NK buňky (Obr. 2) byly poprvé popsány v 70. letech jako lymfocyty schopné bez předchozí stimulace cytotoxicky rychle zabíjet nádorové buňky. [9]

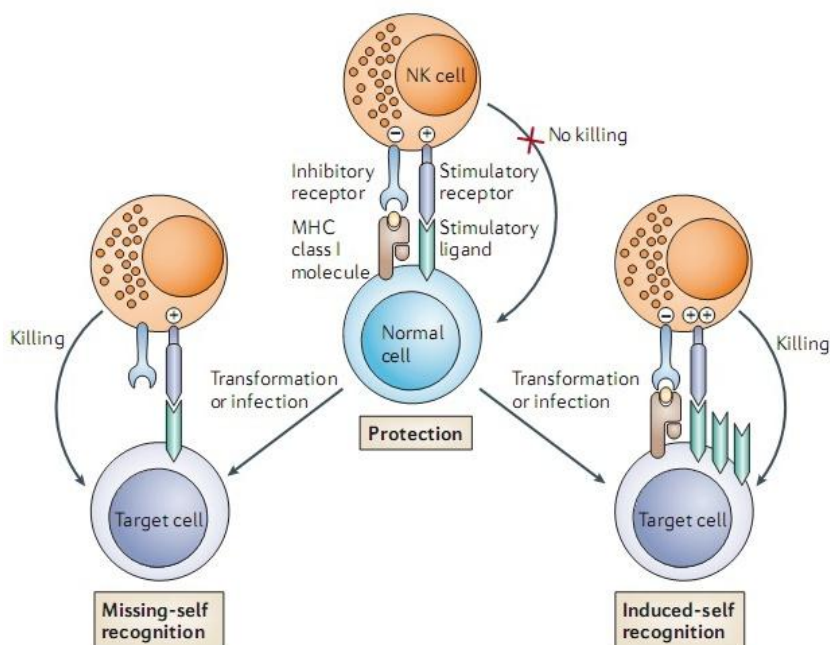


Obr. 2 Mikroskopická fotka NK buněk 3000x zvětšeno [10]

Vyskytují se zejména v periferní krvi, slezině a játrech jako velké granulární lymfocyty bez antigenně specifických povrchových receptorů, typických pro B a T-lymfocyty, i když pocházejí ze stejné lymfoidní linie. [8] [11] Obsahové zastoupení těchto lymfocytů v krvi je kolem 10-15 %. [12] NK buňky nenesou specifický diferenciační znak a jsou nejčastěji charakterizovány fenotypem $CD3^- CD16^{+/-} CD56^+ CD161^{+/-}$ jsou významnými producenty $IFN-\gamma$ a nejsou schopny produkovat IL-2. [6] [13]

Spolu s T_c buňkami mají schopnost cytotoxického zabíjení, ale jinak je jejich rozpoznávání abnormálních buněk oproti lymfocytům komplexnější. [7] Jejich působení společně s T_c lymfocyty je navzájem komplementární a tak T_c buňky rozpoznávají na povrchu buněk MHC I glykoproteiny, cílem NK buněk jsou buňky s potlačenou expresí MHC I glykoproteinů, čímž se buňky mohou bránit právě specifickému rozeznávání T_c buňkami. [2] [14] [15] [16] Tento mechanismus se označuje „missing self“ hypotéza (Obr. 3). [17] Při setkání NK buňky s jinou dochází buď k aktivaci nebo inhibici NK buněčné činnosti, dle převažujících aktivačních nebo inhibičních signálů. [18] [19] V případě normálního množství MHC I glykoproteinů na povrchu buňky dojde k převaze negativních signálů a NK buňka se tak neaktivuje. Je-li na povrchu cílové buňky abnormálně málo MHC I glykoproteinů, převáží aktivační signály a abnormální

buňka je cytotoxicky zabita. [20] Samotný nedostatek MHC I glykoproteinů však nepostačuje a k plné aktivaci buňky je potřeba, aby se na povrchu cílové buňky vyskytovaly ve zvýšené míře ligandy aktivačních receptorů „induced self” hypotéza (Obr. 3), což zabezpečuje, že NK buňky nenapadají např. erytrocyty, které na svém povrchu neexprimují MHC I glykoproteiny. [21] [22]



Obr. 3 Znáznornění „missing self” a „induced self” hypotézy [19]

Rychlost reakce staví NK buňky do role obránců první linie a intenzita a kvalita cytotoxické odpovědi je závislá na kooperaci s ostatními buňkami imunitního systému, zejména na dendritických buňkách, kdy jejich vzájemné spojení vede ke vzniku tzv. stimulační synapse a na povrch NK buněk se začne vylučovat IL-12. [23] [24] [25] Tento interleukin je aktivačním induktorem buňky, což vede k sekreci IFN- γ , čímž se zvyšuje její cytotoxicita a v cytoplazmě NK buňky se začnou tvořit cytotoxické granule s obsahem granzymů (serinových proteáz) a perforinu. [26] [27] Při styku buněk dojde k sekreci těchto granzymů do synaptické štěrby a perforin se zabuduje do membrány hostitelské buňky, kde polymeruje a vytvoří pór o velikosti 15 nm, který umožní průnik granzymů do buňky a tím se pomocí kaspas aktivuje řetězec reakcí vedoucí k fragmentaci DNA či jednořetězcovým zlomům končící apoptickou smrtí hostitelské buňky. [28] [29]

Kromě funkce protinádorového imunitního dohledu hrají roli i při napadení některými viry a v regulačních mechanismech a to především prostřednictvím cytokinů. Taktéž podporují hojení a hrají roli při orgánových transplantacích, HIV, autoimunitních reakcích astmatu či napadení parazity. [30] Byl prokázán zvýšený výskyt nádorových onemocnění u lidí se sníženou aktivitou NK buněk. [31]

1.5 Receptory NK buněk

Receptory NK buněk jsou kódovány na NK genovém komplexu (NKC) či na komplexu leukocytárních receptorů (LRC). Mnou zkoumavé receptory jsou kódovány na NKC, obsahují CRD a patří do rodiny lektinů, tedy proteinů schopných vázat sacharidy, aniž by měnily jejich strukturu. Většina zástupců z této skupiny má vazebnou aktivitu a svou strukturu závislou na přítomnosti vápenatého kationtu, a nazývají se C-lektiny. Jelikož se v extracelulární části proteinů nachází C-konec řetězce, jedná se o C-lektiny II. typu. [1] Nejčastěji se vyskytují ve formě dimerů s obsahem šesti cysteinových zbytků v extracelulární části tvořících disulfidické vazby. NK receptory se rozdělují do několika rodin genů např. Ly-49 (u myší, potkanů a skotu), NKR-P1 (u myší, potkanů, skotu a člověka), NKG2 (u lidí, skotu a potkanů) a CD94 (u lidí). [8]

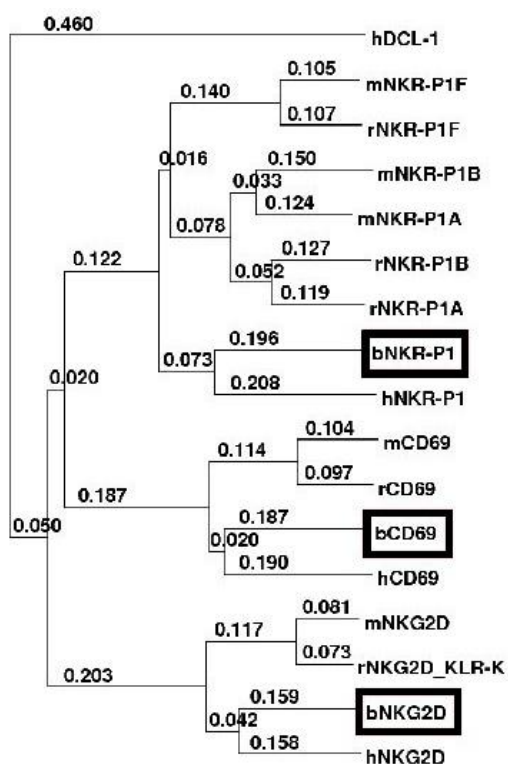
NK receptory mohou být stimulačního (aktivačního) nebo inhibičního charakteru a to i v rámci stejné rodiny. Aktivační receptory nejčastěji obsahují ve své transmembránové části aminokyseliny s pozitivně nabitým postranním řetězcem jako arginin nebo lysin. [14] [32] Signalizace těchto aktivačních receptorů je založena na reakci, kdy transmembránová část receptorů interaguje s adaptorovými proteiny DAP10, DAP12, FcεRIγ a CD3ζ, které NK buňka exprimuje a které obsahují v transmembránové části kyselinu asparagovou, potřebnou ke stabilní asociaci s receptory. [33] [34] [35] V transmembránové části adaptorových proteinů se vyskytují tzv. ITAM, což jsou krátké konzervované úseky AMK o sekvenci D/Ex₍₇₋₈₎D/ExxYxx(L/I/V)_{x(7)}YxxL/I/V, kde x je libovolná aminokyselina. [14] [36] Navázání adaptorů na receptory vede k aktivaci protein-tyrosin-kinas, což způsobí fosforylaci tyrosinu v ITAM. [37] [38] [39] Tyto fosfotyrosiny se vážou na protein-

tyrosin-kinasy rodiny Syk a zapojí se tak do signalizační kaskády. [40] Molekula DAP10 neobsahuje ITAM, ale krátkou signalizační sekvenci YxxM. [41]

Inhibiční receptory obsahují v intracelulární části řetězce ITIM o sekvenci I/S/V/LxYxxL/V. [42] [43] Po navázání adaptoru dochází k fosforylaci tyrosinu a navázání na protein-tyrosin-kinasy rodiny Src, následně však dojde k asociaci s fosfatasami SHP-1 nebo SHP-2, které se vážou na fosfotyrosin svými SH-2 doménami, což zapříčiňuje zvýšení aktivity fosfatas a jejich následnou účast na defosforylaci intracelulárních signalizačních proteinů např. FcεRIγ, ZAP70, Syk či Vav-1. [44] Konečným efektem defosforylace je inhibice signalizačních kaskád které vedou k indukci efektorových funkcí NK buněk. [45] [46] [47]

1.6 Bovinní NK receptory

Bovinní NK receptory byly vybrány na základě spolupráce s Dr. Karlem Klischem, z Institute of Animal Health, Velká Británie. Na vytvořeném fylogenetickém stromu (Obr. 4) můžeme vidět velkou podobnost s lidskými receptory (h), oproti myším (m) nebo potkaním (r) receptorům. Fenotypové označení bovinních NK buněk je shodné s fenotypovým označením NK buněk vyskytujících se u jiných druhů zvířat a je tedy $CD3^- CD16^{+/-} CD56^+ CD161^{+/-}$. [48] [49]



Obr. 4 Fylogenetický strom příbuznosti NK receptorů

Bovinní imunoglobulinové receptory NK buněk patří do rodiny KIR, skládají se ze čtyř genů kódovaných LRC vyskytujícím se u skotu na 18. chromozomu a byla u nich prokázána existence rozdílných signalizačních motivů, což se dříve předpokládalo pouze u primátů. [50]

Bovinní C-lektinové receptory jsou kódované NKC, který se vyskytuje u skotu na 5. chromozomu. Byl objeven jeden receptor patřící do rodiny Ly-49 s ITIM, což potvrzuje hypotézu, že existence více Ly-49 genů se vyskytuje pouze u hlodavců. [51] [52]

Nyní jsou studovány role NK buněk u důležitých infekčních onemocnění skotu. Poslední výzkumy dokázaly významně vyšší hladinu perforinu u dospělého skotu než u telat. [48] Také se prokázalo, že u novorozených telat mladších osmi dní se v krvi vyskytuje až o 30 % menší počet NK buněk než je tomu u starších telat. Po stimulaci jsou však schopny 4-5x více produkovat IL-12. NK buňky u novorozených telat jsou tak více cytotoxické než u starších telat, což kompenzuje nedostatečně rozvinutou specifickou imunitu novorozenců. [49]

1.6.1 CD69

CD69 je C-lektinový receptor označovaný jako časně aktivační antigen leukocytů, protože po aktivaci buňky se ihned začne exprimovat na povrch NK buňky. Přestože jsou dobře popsány receptory pocházející z člověka, myši a potkana, o receptoru ze skotu není mnoho informací. Byla prokázána téměř 80% identita sekvence nukleotidů s lidským CD69. [53]

1.6.2 NKR-P1

NKR-P1 je důležitý aktivační receptor na povrchu NK buněk a je také označován jako receptor KLRB-1b. Identita s lidskou sekvencí nukleotidů NKR-P1 je přibližně 80 %. [51]
[54]

1.6.3 NKG2D

Podrobně byl zkoumán receptor NKG2D, u kterého byl objeven ITAM a adaptorové molekuly DAP10 a DAP12, což se vyskytuje i u lidského, myšího a prasečího homologu. [55]

2 Cíl práce

Na základě konstruktů připravených v bakalářské práci budou produkovány bovinní receptory CD69, NKRP1 a NKG2D.

Mým úkolem bylo:

- oprava bodových mutací vzniklých v DNA konstruktech
- produkce proteinů ve větším zásobním množství
- izolace proteinů
- renaturace proteinů

3 Materiál

Analytické váhy AL54	<i>Mettler Toledo, ČR</i>
Automatické pipety P2-P1000	<i>Gilson, USA</i>
Centrifuga Avanti J-26 XP	<i>Beckman Coulter, USA</i>
Centrifuga J-6M	<i>Beckman Coulter, USA</i>
Centrifuga Z 233 MK-2	<i>Hermle, Německo</i>
Centrifugační koncentrátor Amicon Ultra 10kDa	<i>Millipore, USA</i>
Dialyzační trubice Spektra/Por	<i>Spektrum Lab., USA</i>
Filtry PVDF 0,22 µm	<i>Sigma-Aldrich, USA</i>
HPLC systém BioSys 510	<i>Beckman Coulter, USA</i>
Kolona Superdex 75 HR 10/300	<i>GE Healthcare, Švédsko</i>
Magnetická míchačka MM 2A	<i>Laboratorní přístroje Praha, ČR</i>
Monochromátorová čtečka destiček Safire	<i>Tecan, Švýcarsko</i>
Napájecí zdroj MP-250V	<i>AND, USA</i>
pH metr Ø200	<i>Beckman Coulter, USA</i>
Předvážky HF-1200G	<i>AND, USA</i>
PVDF membrána	<i>Pall Corp., USA</i>
Souprava pro agarosovou elektroforézu	<i>Sigma-Aldrich, USA</i>
Souprava pro elektroforézu	<i>Sigma-Aldrich, USA</i>
Souprava pro elektropřenos	<i>Sigma-Aldrich, USA</i>
Souprava pro SDS-PAGE	<i>Bio-Rad, Německo</i>
Souprava pro ultrafiltraci	<i>Sigma-Aldrich, USA</i>
Spektrofotometr DU-70	<i>Beckman Coulter, USA</i>
Termocykler	<i>Eppendorf, Německo</i>
Termostat BT 120M	<i>Lab.přístroje Praha, ČR</i>
Třepačka na Erlenmeyerovy baňky	<i>Gallenkamp Ltd., UK</i>
Třepačka na zkumavky BigGer Bill	<i>Thermolyne, USA</i>
Ultracentrifuga Optima LE-80K	<i>Beckman Coulter, USA</i>
Ultrafiltrační membrány 10 kDa	<i>Sigma-Aldrich, USA</i>
Ultrazvuková lázeň	<i>KRAINTEK, Slovensko</i>

Ultrazvuková sonda Ultrasonic Homogenizer 4710	<i>Cole-Parmer Instrum. Co., USA</i>
UV lampa UVGL-58	<i>Science Company, USA</i>
Vortexový mixér	<i>VELP Scientifica, Itálie</i>
Zdroj deionizované vody MilliQ Academic	<i>Millipore, USA</i>
Zdroj napětí BM 551	<i>Tesla, ČR</i>

3.1 Chemikálie

2-merkaptoethanol	<i>Sigma-Aldrich, USA</i>
4-hydroxy- α -kyanoskořicová kyselina	<i>Sigma-Aldrich, USA</i>
Acetonitril	<i>Merck, Německo</i>
Agar	<i>Oxoid, Anglie</i>
Agarosa	<i>Jersey Lab Supply, USA</i>
Akrylamid	<i>Sigma-Aldrich, USA</i>
Ampicilin	<i>Biotika, SR</i>
Azid sodný	<i>Sigma-Aldrich, USA</i>
BCA	<i>Sigma-Aldrich, USA</i>
Bromfenolová modř	<i>Lachema, ČR</i>
Coomassie Brilliant Blue R-250	<i>Serva, Německo</i>
Cystamin	<i>Sigma-Aldrich, USA</i>
Cysteamin	<i>Sigma-Aldrich, USA</i>
Činidlo pro stanovení dle Bradfordové	<i>Bio-Rad, Německo</i>
DMSO	<i>Jersey Lab Supply, USA</i>
dNTP	<i>Fermentas, Kanada</i>
Dodecylsulfát sodný	<i>Jersey Lab Supply, USA</i>
DTT	<i>Sigma-Aldrich, USA</i>
EDTA	<i>Sigma-Aldrich, USA</i>
Ethidiumbromid	<i>Jersey Lab Supply, USA</i>
Glycin	<i>Sigma-Aldrich, USA</i>
Guanidin hydrochlorid	<i>Jersey Lab Supply, USA</i>
Hovězí sérový albumin	<i>Sigma-Aldrich, USA</i>
IPTG	<i>Sigma-Aldrich, USA</i>

Kanamycin	<i>Sigma-Aldrich, USA</i>
Kvasničný autolýzát	<i>Imuna Pharm, ČR</i>
L-Arginin hydrochlorid	<i>Sigma-Aldrich, USA</i>
Leupeptin	<i>Sigma-Aldrich, USA</i>
N,N'-methylen-bis-akrylamid	<i>Sigma-Aldrich, USA</i>
Peroxodisíran amonný	<i>Sigma-Aldrich, USA</i>
PMSF	<i>Sigma-Aldrich, USA</i>
Sacharosa	<i>Sigma-Aldrich, USA</i>
Standard pro agarosovou elektroforézu	<i>New England Biolabs, USA</i>
Standardy pro SDS-PAGE	<i>Serva, Německo</i>
TEMED	<i>Serva, Německo</i>
Tetracyklin	<i>Jersey Lab Supply, USA</i>
TFA	<i>Sigma-Aldrich, USA</i>
Tris	<i>Jersey Lab Supply, USA</i>
Triton X-100	<i>Sigma-Aldrich, USA</i>
Trypton	<i>Oxoid, Anglie</i>
 Ostatní běžné chemikálie	 <i>Lachema, ČR</i>

3.2 Enzymy

Deep Vent DNA polymerasa (2000 U/ml)	<i>New England Biolabs, USA</i>
DNAasa I (10 U/μl)	<i>Sigma-Aldrich, USA</i>
DpnI (2000 U/ml)	<i>Invitrogen, USA</i>
Lysozym (Hen Egg White)	<i>Sigma-Aldrich, USA</i>
Pfu Turbo polymerasa (2000 U/ml)	<i>Invitrogen, USA</i>
Platinum Taq polymerasa (2000 U/ml)	<i>Invitrogen, USA</i>
RNAasa A (10 mg/ml)	<i>Sigma-Aldrich, USA</i>
Trypsin (0,1 mg/ml)	<i>Promega, USA</i>

3.3 Vektory

pET-30a(+) (1 µg/µl)

Novagen, USA

pRSET B (1 µg/µl)

Invitrogen, USA

3.4 Bakterie

Epicurian coli® BL21-Gold(DE3): *E. coli* B F⁻ *ompT* *hsdS*(r_B⁻ m_B⁻) *dcm*⁺ Tet^r *gal* (DE3)
endA Hte

Stratagene, USA

3.5 Oligonukleotidy

Reverzní primer BOVNKRPR

Generi Biotech, ČR

5' caaagcttacttcagttccttttggcagatcca 3'

Přímý primer BOVNKRPF

Generi Biotech, ČR

5' tgcatatgttaacgtgtccaatgcactggaaa 3'

Reverzní primer bNKGmutre

Generi Biotech, ČR

5' catctttgctgtatatcttcagg 3'

Přímý primer bNKGmutfw

Generi Biotech, ČR

5' cctgaagatatacagcaaagatg 3'

3.6 Roztoky

Akrylamidový mix: 29 % (w/v) akrylamid, 1 % (w/v) N,N'-methylen-bis-akrylamid

Dialyzační pufr: 15 mM Tris, 150 mM NaCl, 1 mM NaN₃, pH = 8,5

Guanidinový pufr: 6 M Guanidin-HCl, 10 mM DTT, pH = 8,0

LB agar: 1,5 % agar v LB médiu

N-Ethylmorpholinový pufr: 50 mM ethylmorpholin, 10 % AcN, 0,01 % merkptoethanol, pH = 8,1

PCR pufr – Thermo pol, 10 mM KCl, 10 mM (NH₄)₂SO₄, 20 mM Tris, 2 mM MgSO₄, 0,1 % Triton X-100, pH = 8,8 (*New England Biolabs, USA*)

Pufr pro agarosovou elektroforézu – TAE pufr, 40 mM Tris, 20 mM kyselina octová, 1 mM EDTA

Pufr pro elektropřenos: 10 mM Tris-HCl, 150 mM glycin, 20 % (v/v) methanol, pH = 8,4

Pufr pro gelovou chromatografií: 15 mM Tris, 150 mM NaCl, 1 mM NaN₃, pH = 8,5

Pufr pro SDS-PAGE - elektrodový: 10 mM Tris-HCl, 250 mM glycin, 0,1 % (w/v) SDS, pH = 8,3

Renaturační pufr: 0,4 M L-arginin, 100 mM Tris, 10 mM CaCl₂, 3 mM cysteamin, 1 mM cysteamin, 1 mM NaN₃, pH = 8,5

Roztok pro izolaci inkluzních tělísek - promývací: 50 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 1 mM merkptoethanol, 1 mM NaN₃, pH=7,4

Roztok pro izolaci inkluzních tělísek - s detergentem: 0,5% (w/v) Triton X-100, 50 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 1 mM merkptoethanol, 1 mM NaN₃, pH=7,4

Roztok pro izolaci inkluzních tělísek - sacharový: 25 % (w/v) sacharosa, 50 mM Tris, 1 mM EDTA, 1 mM NaN₃, pH=7,4

Roztok pro PVDF membrány - odbarvovací: 45 % (v/v) methanol, 10 % (v/v) kyselina octová

Roztok pro SDS-PAGE - barvicí: 45 % (v/v) methanol, 10 % (v/v) kyselina octová, 0,25 % (w/v) CBB R-250

Roztok pro SDS-PAGE - fixační a odbarvovací: 35 % (v/v) ethanol, 10 % (v/v) kyselina octová

STOP pufr: 30 % glycerol, bromfenolová modř, TE pufr

Vzorkový pufr pro SDS-PAGE neredukující: 50 mM Tris-HCl, 12 % (v/v) glycerol, 4 % SDS (w/v), 0,1 % (w/v) bromfenolová modř, pH = 6,8

Vzorkový pufr pro SDS-PAGE redukující: 50 mM Tris-HCl, 12 % (v/v) glycerol, 4 % SDS (w/v), 0,1 % (w/v) bromfenolová modř, 100 mM DTT, pH = 6,8

3.7 Média

LB médium: 1 % trypton, 0,5 % kvasničný extrakt, 1 % NaCl, pH = 7,4

- použité koncentrace antibiotik:

- ampicilin 150 µg/ml (zásobní koncentrace 150 mg/ml),
- kanamycin 50 µg/ml (zásobní koncentrace 50 mg/ml),
- tetracyklin 12,5 µg/ml (zásobní koncentrace 5 mg/ml)

4 Metody

4.1 Příprava konstruktů

4.1.1 PCR

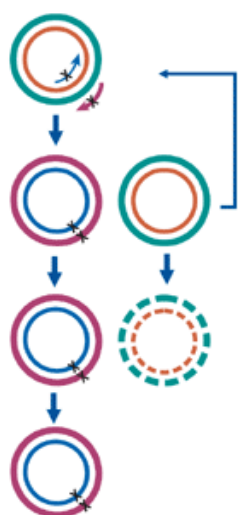
Pro PCR byla připravena reakční směs skládající se z 2 μ l (10 μ g/ml) templátu, 5 μ l 5 μ M zpětného primeru, 5 μ l 5 μ M přímého primeru, 5 μ l PCR pufru (10x koncentrovaný), 2 μ l 50 mM $MgCl_2$, 2 μ l 10 mM dNTP, 29 μ l H_2O , 0,4 μ l DNA polymerasy. Pro PCR reakci bylo vyzkoušeno několik druhů polymeras a to Platinum Taq polymerasa, která není náročná na optimalizaci podmínek, ale vytváří jedno vlákno s adenosinovým přesahem, což komplikuje pozdější klonování. Poté se použila Deep Vent polymerasa, která již produkuje tupé konce, ale je náročnější na podmínky průběhu PCR.

4.1.2 Agarosová elektroforéza

Dle předpokládané velikosti fragmentů DNA (o délce 400 bp) se připravil 1,5% gel rozpuštěním odpovídajícího množství agarosu v TAE pufru s přídavkem 2 μ l ethidium bromidu (10 mg/ml), po jehož interkalaci lze detekovat DNA pod UV zářením. Zde bylo použito dlouhovlnné záření o délce 365 nm, aby se snížila pravděpodobnost vzniku mutací v DNA oproti krátkovlnnému záření, které je k detekci účinnější. Elektroforéza probíhala při 40 mA po dobu 45 min.

4.1.3 Oligonukleotidově řízená mutageneze

Také byla použita metoda oligonukleotidově řízené mutageneze znázorněna na Obr. 5, která vyžaduje navrhnutí nových vzájemně komplementárních a antiparalerních primerů, které nasednou na oblast mutace, a DNA polymerasa syntetizuje vlákno dále po kruhu plazmidu. Používá se Pfu Turbo polymerasa, která je náročnější na optimalizaci teplotních podmínek PCR, ale dosahuje největší přesnosti při tvorbě komplementárního vlákna DNA, dochází tak k malému počtu chyb na počet páru bází a je tak vhodná k opravám bodových mutací, kdy dochází k amplifikaci celých vektorů, tedy řádově tisíců bází. Po syntéze je potřeba odstranit templátovou DNA, což se provádí endonukleasou DpnI.



Nasednutí primerů na místo s opravovaným párem bází (uprostřed sekvence, zde označený křížkem).

Amplifikace celého vektoru spolehlivou polymerasou. Opravovaná báze je změněná, neboť byla obsažena v primerech. Probíhá v cyklech jako klasická PCR, výsledkem je tedy velké množství „opravených“ kopií.

Restrikční endonukleasa DpnI štěpí rozpoznávanou sekvenci (GATC) jen obsahuje-li methylovaný adenin. Rozštěpí tedy jen původní bakteriální DNA sloužící jako předloha.

Výsledkem je roztok obsahující již jen opravený plazmid.

Obr. 5 Znáznění oligonukleotidově řízená mutagenese, upraveno dle [56]

4.1.4 Restrikce DpnI

K roztoku vzorku po PCR s Pfu Turbo polymerasou byl přidán 1 μ l DpnI endonukleasy, která štěpí pouze methylované a hemimethylované úseky DNA. V tomto případě rozkládá templátovou DNA, která je methylovaná, protože bakteriální DNA je před účinkem restrikčních endonukleas chráněna methylací. Směs se nechala reagovat 1 h při 37 °C.

4.2 Příprava proteinu

4.2.1 Transformace do bakteriálních buněk

Do kompetentních bakteriálních buněk byla plazmidová DNA vnesena metodou transformace tepelným šokem.

Zamražené bakteriální buňky (*E. coli*) se nechaly postupně roztát na ledové lázni. Ke 200 µl bakteriální suspenze se přidalo 0,1-1 µg plazmidové DNA a směs se nechala 20 minut inkubovat na ledu a následně se vložila do 42 °C teplé lázně na 45 sec a poté se zchladila na ledu. Po tepelném šoku se přidá 1 ml LB média a směs se nechá inkubovat při 37 °C po dobu jedné hodiny. Směs se odstředila (5000 x g, 4 min), supernatant byl odlit a peleta resuspendována a nanесena na Petriho misku s LB agarem se selekčními antibiotiky a ponechána inkubovat při 37 °C do vzniku viditelných kolonií.

4.2.2 Selektce produkčního klonu

Vybrané kolonie byly asepticky přeneseny do 1 ml LB média s příslušnými antibiotiky a dále kultivovány do stacionární fáze růstu při 37 °C a 220 ot./min. Z každé zkumavky bylo přeočkováno po 100 µl kultury do dvou zkumavek s 1 ml LB média s ATB a kultivováno 3 h při 37 °C a 220 ot./min. Zbytek inokula byl uchován pro pozdější velkoobjemovou produkci. Do jedné sady zkumavek označené „+“ byl přidán induktor proteinové exprese IPTG do jeho výsledné koncentrace 1 mM. Všechny zkumavky se dále nechaly kultivovat 2 h při 37 °C. Kultury poté byly odstředěny (5000 x g, 5 min) a jejich pelety resuspendovány ve 150 µl redukujícího vzorkového pufru pro SDS PAGE, povařeny 5 min na vodní lázni a odstředěny (10000 x g, 10 min).

4.2.3 SDS PAGE

Vzorky proteinů byly analyzovány v 15% polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecylsulfátu sodného. Čtyři separační gely byly připraveny napipetováním 4,6 ml H₂O, 10 ml 30% akrylamidového mixu, 5 ml 1,5 M Tris (pH = 8,8); 0,2 ml 10% SDS; 0,2 ml 10% APS a 8 µl TEMED. Přes separační gely byl nanесen zaostřovací gel připravený napipetováním 2,7 ml H₂O; 0,67 ml 30% akrylamidového mixu; 0,5 ml 1 M Tris (pH 6,8); 0,04 ml 10% SDS; 0,04 ml 10% APS a 0,004 ml TEMED. Elektroforéza

probíhala v prostředí elektrodového pufru pro SDS PAGE po dobu 90 min a proudy 25 mA/gel. Nanášený objem vzorku do jamek byl 10 µl a standardu molekulových hmotností se pipetovalo 5 µl. Po skončení separace byly gely barveny 10 min v barvicím roztoku pro SDS PAGE a poté odbarvovány alespoň 1 h ve fixačním roztoku pro SDS-PAGE.

4.2.4 Optimalizace produkce

Optimalizovanými parametry byl čas produkce a koncentrace induktoru IPTG. Kultura vybraného produkčního klonu bakterií byla kultivována v LB médiu s antibiotiky při 37 °C a 220 ot./min do časně log fáze růstu. Při optimalizaci času produkce byl k buňkám přidán induktor IPTG do výsledné koncentrace 1 mM a od této chvíle byl měřen čas produkce. V časech 1, 2, 3, 5, 10 a 24h byl odebírán vzorek kultury, ihned odstředěn (5000 x g, 10 min), sediment zamražen a poté všechny vzorky byly najednou detekovány SDS-PAGE. Při optimalizaci koncentrace IPTG v roztoku, byla opět kultura vybraného produkčního kmene bakterií kultivována v LB médiu s antibiotiky při 37 °C a 220 ot./min do časně log fáze růstu a rozdělena po 1 ml do zkumavek. Poté byl ke kulturám ve zkumavkách přidán induktor IPTG v koncentracích 0,05; 0,1; 0,2; 0,3; 0,5; 1; 2 mM. Jeden vzorek kultury byl ponechán bez přidání induktoru pro porovnání a následovala 3 h kultivace za stejných podmínek. Vzorky kultur byly odstředěny (5000 x g, 10 min) a připraveny ke zpracování pomocí SDS-PAGE.

4.2.5 Velkoobjemová produkce

Velkoobjemová produkce probíhala v 500 ml LB média s ATB, které se naočkovalo 0,5 ml noční kultury vybraného produkčního klonu. Směs se nechala kultivovat při 37 °C a 220 ot./min do absorbance 0,7 měřené při 550 nm. Byl přidán induktor IPTG do výsledné koncentrace 0,1 mM a suspenze se inkubovala 3 h při 37 °C a 220 ot./min. Buněčná kultura se odstředila (5000 x g, 10 min, 4 °C) a supernatant byl odlit.

4.2.6 Izolace inkluzí

Pelety z 500 ml bakteriální kultury byly resuspendovány ve 20 ml sacharosového pufru, ke kterému byl přidán leupeptin na výslednou koncentraci 1 μ M a PMSF na výslednou koncentraci 1 mM. Suspenze byla čtyřikrát zmražena a sonikována a poté k ní bylo přidáno 400 μ l 1 M $MgCl_2$, 2 μ l DNAsy I ($c = 10$ U/ μ l) a 5 μ l RNAsy I ($c = 10$ μ g/ μ l) a směs se nechala 30 min reagovat při laboratorní teplotě. Následně byla suspenze třikrát sonikována po dobu 30 s a odstředěna (8000 x g, 15 min, 4 °C). Sediment byl resuspendován sonikací v 20 ml pufru s detergentem, ke kterému byl přidán leupeptin na výslednou koncentraci 1 μ M a PMSF na výslednou koncentraci 1 mM a odstředěn (8000 x g, 15 min, 4 °C). Peleta byla resuspendována v 20 ml pufru na odstranění detergentu, ke kterému byl opět přidán leupeptin na výslednou koncentraci 1 μ M a PMSF na výslednou koncentraci 1 mM a směs byla odstředěna (8000 x g, 15 min, 4 °C). Tento sediment byl zamražen na -20 °C a uchován pro další experimenty.

4.2.7 Renaturace

Sediment inkluzních tělísek byl resuspendován do úplného rozpuštění v roztoku 6M guanidinu-HCl a 10mM DTT a odstředěn (185 000 x g, 30 min). Protein byl renaturován metodou rychlého naředění, kdy supernatant po ultracentrifugaci byl při 4 °C za stálého míchání po kapkách pomalu přidán do renaturačního pufru.

Po nakapání byly roztoky nality do dialyzačních trubic a dvakrát dialyzovány 5 h při 4 °C v 8 l dialyzačního pufru. Roztok proteinu po dialýze byl zkoncentrován ultrafiltrační sadou s membránou z PLGC celulosy s limitem propustnosti 10 kDa a při tlaku 0,5 MPa dusíku.

4.2.8 Gelová filtrace

K purifikaci připravených proteinů se osvědčilo využívání chromatografických metod, zejména gelové filtrace. Používala jsem kolonu Superdex 75 HR 10/300 na HPLC systému BioSys 510 s průtokovým fotometrickým detektorem při 280 nm a izokratické eluci. Kolona se po separaci promývala 0,5 M roztokem NaOH, destilovanou vodou a 20% roztokem ethanolu, v kterém se též skladovala.

4.2.9 Stanovení koncentrace

4.2.9.1 Stanovení dle Bradfordové

Koncentrace proteinů byla spektrofotometricky stanovována metodou dle Bradfordové, kdy se na mikrotitrační destičku nanese 5 μ l roztoku proteinu a přidalo se 200 μ l činidla dle Bradfordové, směs se nechala 5 min inkubovat při laboratorní teplotě a změřila se absorbance při 595 nm. Kalibrační řada v rozmezí koncentrací 0 – 0,5 mg/ml byla připravena pomocí roztoků BSA.

4.2.9.2 Bicinchoninová kyselina

Metoda s BCA využívá sodné soli kyseliny bicinchoninové ke spektrofotometrickému stanovení proteinu. Reakce využívá alkalické redukce Cu^{2+} na Cu^+ stanoveným proteinem a následně tvorby komplexu Cu^+ s kyselinou bicinchoninovou za vzniku fialového zbarvení. Činidlo se připravuje vždy čerstvé smísením BCA v alkalickém prostředí s CuSO_4 v poměru 50:1 a následně se tento roztok mísí s proteinem v poměru 20:1 a měří se absorbance vzniklého roztoku při 562 nm. Kalibrační řada v rozmezí koncentrací 0 – 0,5 mg/ml byla připravena pomocí roztoků BSA.

4.3 Identifikace

4.3.1 Elektropřenos na PVDF membránu

Po SDS PAGE byl gel inkubován 10 minut v transferovém pufru pro SDS PAGE s 20 % methanolu. PVDF membrána byla ponořena do 100% methanolu a poté do transferového pufru pro SDS PAGE s 20 % methanolu. Na šest vrstev filtračního papíru namočených v transferovém pufru pro SDS PAGE s 20 % methanolu byla položena PVDF membrána a gel na který bylo opět položeno šest vrstev nasyceného filtračního papíru. Elektropřenos probíhal 1 h při proudové hustotě $0,8 \text{ mA/cm}^2$ gelu. Poté byla membrána třikrát opláchnuta vodou, obarvena v barvicím roztoku pro SDS PAGE po dobu 1 min a odbarvena v odbarvovacím roztoku pro elektropřenos. PVDF membrána byla předána Prof. RNDr. Karlu Bezouškovi, DSc. na analýzu aminokyselinové sekvence metodou Edmanova odbourávání.

4.3.2 Identifikace proteinu metodou peptidového mapování

Vzorek byl podroben SDS-PAGE a proužek odpovídající hmotnosti proteinu byl skalpelem vyříznut, nakrájen na drobné části, které byly se 100 μl N-ethylmorpholinoacetátového pufru a 100 μl AcN a inkubovány 1-2 h do odbarvení gelu. Supernatant byl odstraněn a částice byly 5 min rehydratovány se 100 μl vody, která se poté odstranila. K částicím gelu se přidalo se 100 μl AcN a směs se inkubovala 5 min. Supernatant se odsál a postup se opakoval třikrát. Gel se nechal usušit na vzduchu, přidal se 1 μl trypsinu (0,1 mg/ml) a 35 μl N-ethylmorpholinoacetátového pufru, a nechal přes noc inkubovat při 37 °C. Ke gelu se přidá 6-7 μl 5% TFA v AcN, směs se sonikuje a nanese se 0,5 μl na terč, nechá zaschnout a převrství se 0,5 μl matrice, kterou byla 4-hydroxy- α -kyanoskořicová kyselina (10 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$). Analýza hmotnostním spektrometrem MALDI-TOF (Ultraflex III, Bruker, Německo) byla provedena Mgr. Danielem Kavanem Ph.D..

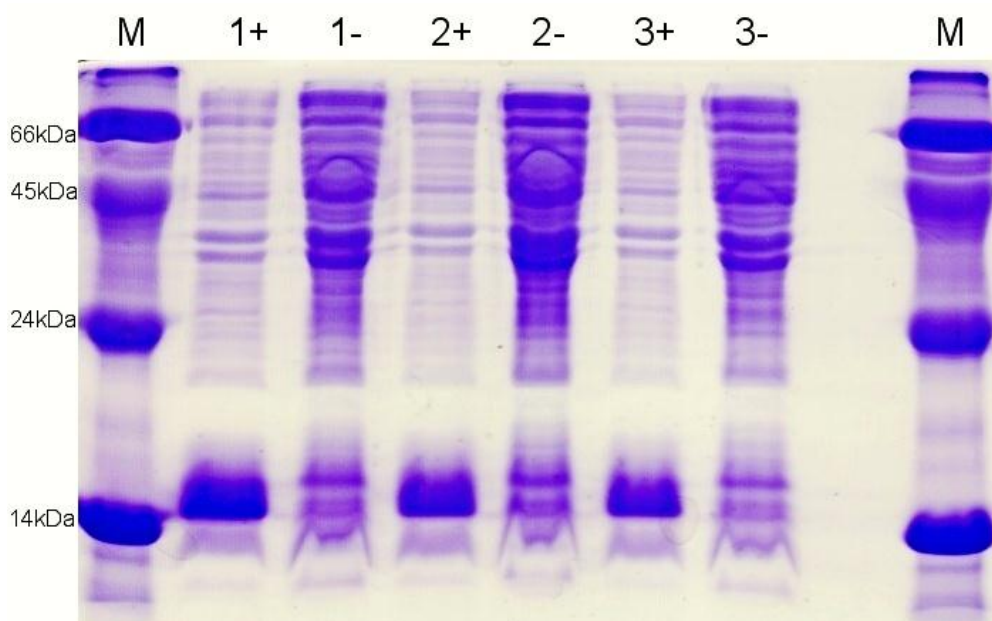
5 Výsledky

5.1 bCD69

5.1.1 Produkce v bakteriálních buňkách

Na transformaci tepelným šokem dle protokolu 4.2.1 byly použity kompetentní buňky *E. coli* BL21-Gold(DE3), které nesou gen odpovědný za rezistenci proti antibiotiku tetracyklinu. Inzert pro protein bCD69 je zaligován v plazmidu pET30a(+), který nese selekční gen rezistence na antibiotikum kanamycin. Resuspendovaná peleta transformovaných buněk je nanášena na Petriho misku s agarem, tetracyklinem a kanamycinem a inkubována 12 h při 37 °C. Vzniklo asi 150 viditelných bílých kolonií a tři z nich byly přeočkovány do 1 ml LB média s antibiotiky a kultivovány 3 h při 37 °C a 220 ot./min a dále se postupovalo dle protokolu 4.2.2 na selekci produkčního klonu.

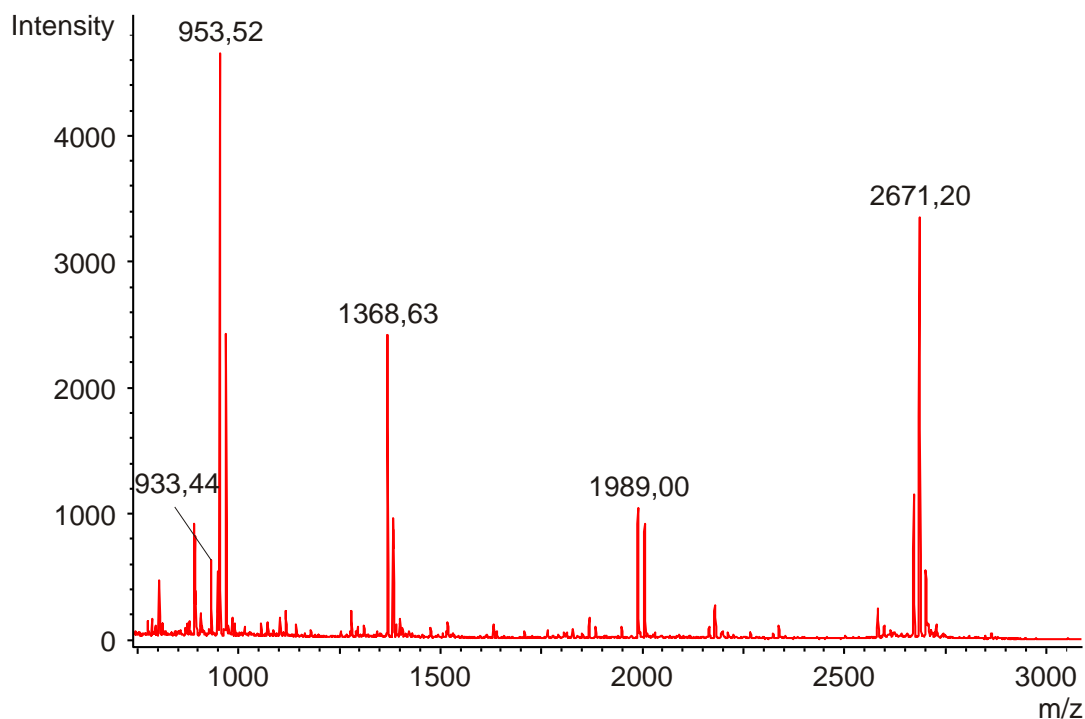
Expresi rekombinantního proteinu byla analyzována SDS PAGE dle 4.2.3 jejíž výsledek je na Obr. 6, kde se hledal klon bakterií, který nejvíce produkuje rekombinantní protein v indukované kultuře oproti neindukované. Můžeme vidět výrazný nárůst produkce proteinu o velikosti 14,5 kDa ve všech indukovaných kulturách označených +, což odpovídá exprimovanému bCD69.



Obr. 6 Selektce produkčního klonu bCD69: M – standard molekulových hmotností; 1+, 2+, 3+ - indukované kultury; 1-, 2-, 3- - neindukované kultury

5.1.2 Identifikace proteinu bCD69

Identita bCD69 byla ověřena metodou peptidového mapování (Obr. 7 a Tab. 1). Tři vybrané hmoty byly navíc ověřeny změřením jejich fragmentačních spekter.



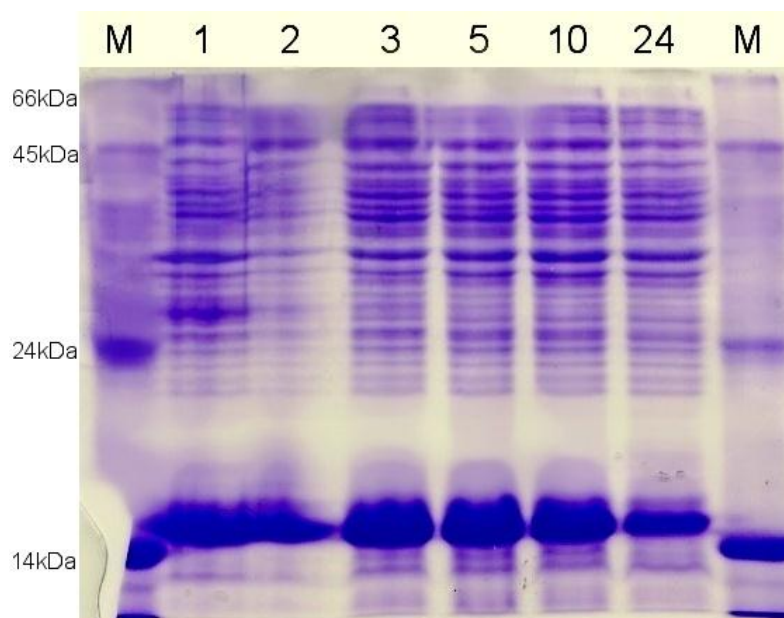
Obr. 7 Hmotnostní spektrum tryptického štěpení bCD69 z elektroforetického gelu

Mw	Sekvence	Modifikace	PSD
933,44	NEAGQTWK (79-86)	Oxidace (949.43)	
953,52	AEHWIGLK (71-78)	Oxidace (969.52) 2x oxidace (985.51)	ANO
1368,6	NWTLAQNFCSK (37-47)	Oxidace (1384,63)	ANO
1989,0	HGATLAVIDSKEDMNFLK (48-65)	Oxidace (2005,00)	
2671,2	GQYASSAPPNTHVFPCSDDWIGHK (2-25)	Nezjištěna	ANO

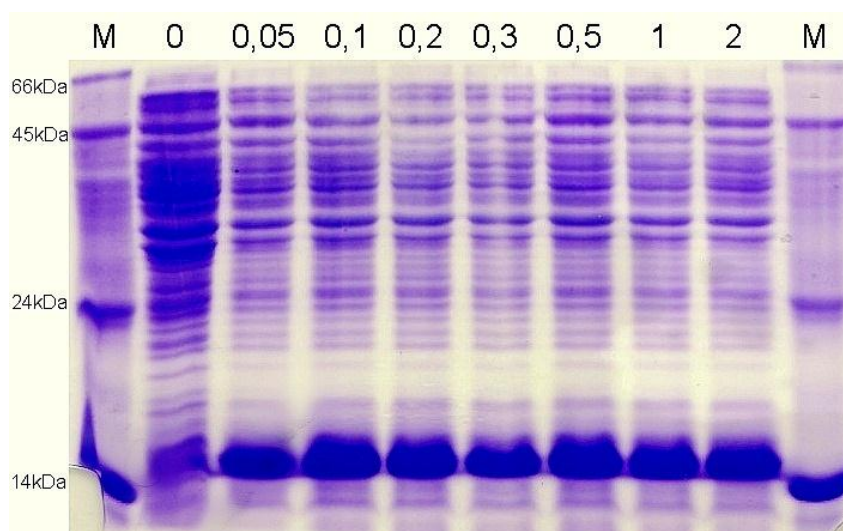
Tab. 1 Přiřazení molekulových hmotností k aminokyselinovým sekvencím

5.1.3 Optimalizace produkce

Účelem optimalizace je zjistit, jak připravit maximální množství proteinu za minimum času s co nejmenší spotřebou chemikálií. Optimalizovanými parametry byl čas a koncentrace induktoru IPTG. Vzorky byly inkubovány za stanovených podmínek dle 4.2.4 a poté analyzovány na SDS PAGE, kdy výsledky pro optimalizaci času jsou na Obr. 8 a pro optimalizaci induktoru na Obr. 9. Jako optimální podmínky byl zvolen čas produkce 3 h a koncentrace induktoru 0,1 mM.



Obr. 8 Optimalizace času produkce bCD69: M – standard molekulových hmotností, v ostatních drahách - čas produkce v hodinách



Obr. 9 Optimalizace koncentrace induktoru IPTG ve výsledném roztoku: M – standard molekulových hmotností, v ostatních drahách – různé koncentrace IPTG v mM

5.1.4 Velkoprodukce

Dle výsledků optimalizace probíhala velkoprodukce dle 4.2.5 v 500 ml LB média obsahujícího kanamycin a tetracyklin. K indukci IPTG na výslednou koncentraci 0,1 mM došlo při $A_{550} = 0,7$, následovala kultivace při 37 °C po dobu 3 h.

5.1.5 Renaturace

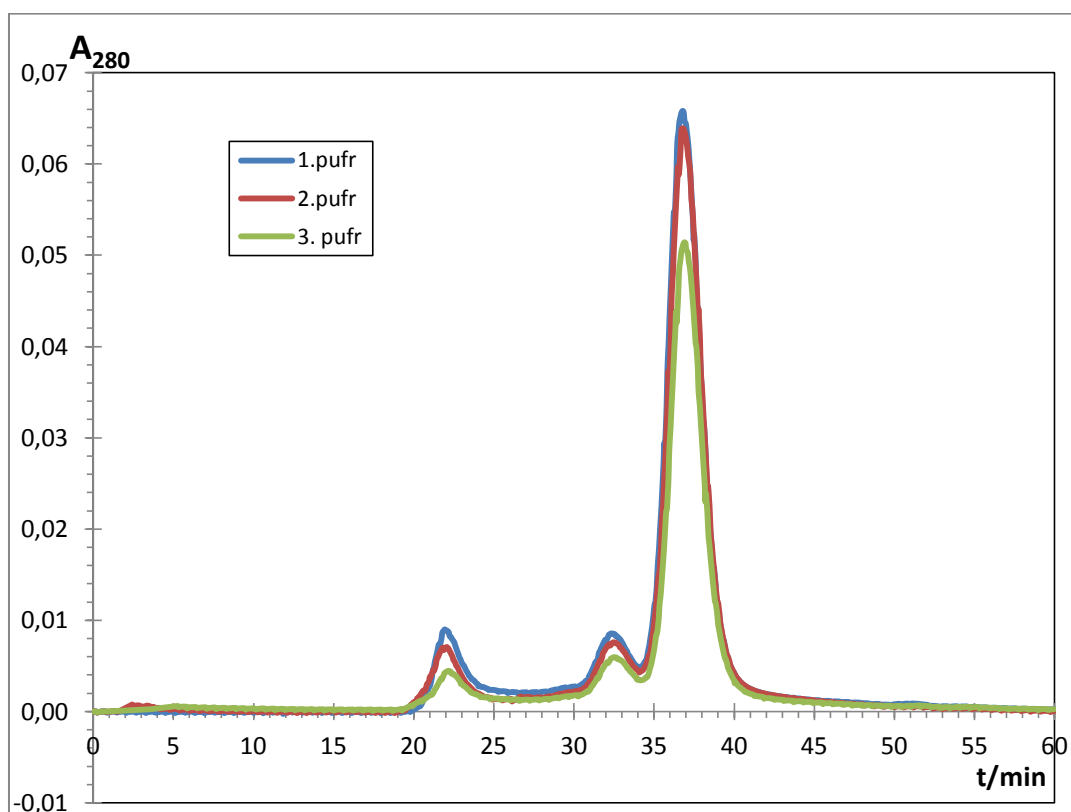
Protein je produkován ve formě inkluzních tělísek, a proto je potřeba jeho izolace dle 4.2.6, renaturace do rozpustné formy dle 4.2.7 se solubilizací v guanidinovém pufru s přídavkem DTT, jakožto redukčního činidla, které zajišťovalo redukci disulfidických můstků v proteinu.

Renaturace byla provedena metodou rychlého naředění proteinu do 50 ml renaturačního pufru obsahujícího L-arginin (nízkomolekulární chaperon), cysteamin a cystamin (redoxní pár zajišťující tvorbu disulfidických vazeb), Tris (udržující pH), chlorid vápenatý (zkoumané proteiny patří do C-lektinů, kde většina zástupců z této skupiny má vazebnou aktivitu a svou strukturu závislou na přítomnosti vápenatého iontu) a azid sodný (konzervant). Neměnné složení pufrů bylo 100 mM Tris-HCl, 10 mM CaCl_2 , 1 mM NaN_3 . Předmětem optimalizace renaturace bylo pH a množství L-argininu, cystaminu a cysteaminu dle Tab. 2.

Renaturační pufr					
	1	2	3	4	5
L- arginin	0,4 M	1 M	0,4 M	0,4 M	0,4 M
pH	8,5	8,5	8,0	8,5	8,5
cysteamin	3 mM	3 mM	3 mM	9 mM	1 mM
cystamin	1 mM	1 mM	1 mM	1 mM	3 mM

Tab. 2 Optimalizace renaturace, kde je růžově vyznačena změněná hodnota koncentrace látek nebo pH

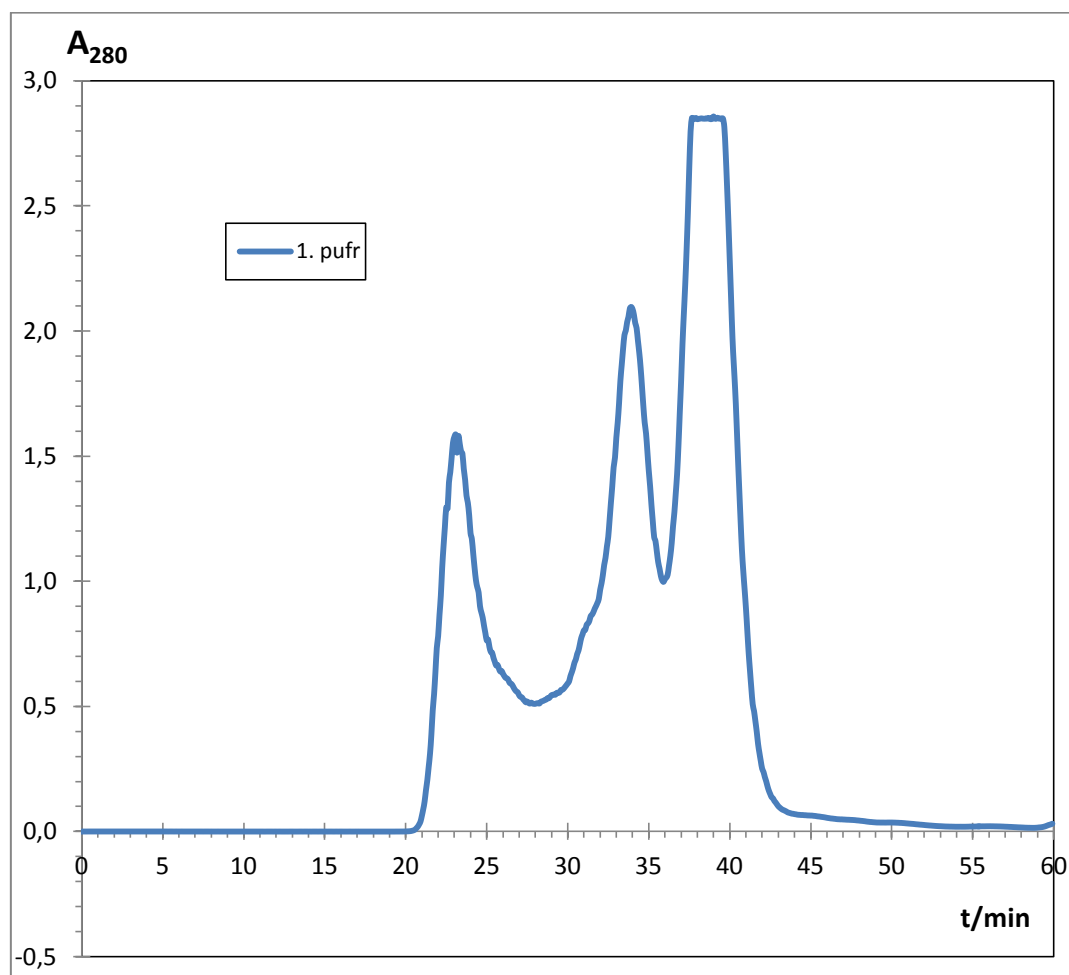
Po přidání proteinu do renatačních pufrů, byly roztoky dialyzovány v dialyzačním pufru o složení 15mM Tris, 150 mM NaCl, 1mM NaN_3 a pH 8,5. Odsolený protein byl zkoncentrován ultrafiltrací na konečný objem 0,5 ml a nanesen na kolonu gelové filtrace Superdex 75 HR 10/300, promytou mobilní fází, která měla stejné složení jako dialyzační pufr tedy 15mM Tris, 150mM NaCl, 1 mM NaN_3 a pH 8,5. Záznam elučních profilů je uveden v následujícím chromatogramu Obr. 10. Retenční čas agregátů je kolem 22 min, dimerní formy proteinu kolem 33 min a monomerní formy kolem 36 min.



Obr. 10 Chromatogram proteinu bCD69 po gelové filtraci na koloně Superdex 75 HR 10/300 a průtoku mobilní fáze 0,4 ml/min o složení 15mM Tris, 150mM NaCl, 1 mM NaN_3 a pH 8,5

Jako nejvhodnější pufr byl vyhodnocen pufr 1 a byl použit při velkoobjemové produkci jako jediný renaturační pufr o objemu 250 ml. Protein bCD69 se v pufrech 4 a 5 v průběhu renaturace a dialýzy vyloučil v nerozpustné formě, a proto nemohl být nanesen na kolonu.

Výsledek velkoprodukce po gelové filtraci bCD69 vidíme na následujícím chromatogramu Obr. 11. Retenční čas agregátů je kolem 22 min, dimerní formy proteinu kolem 33 min a monomerní formy kolem 36 min.

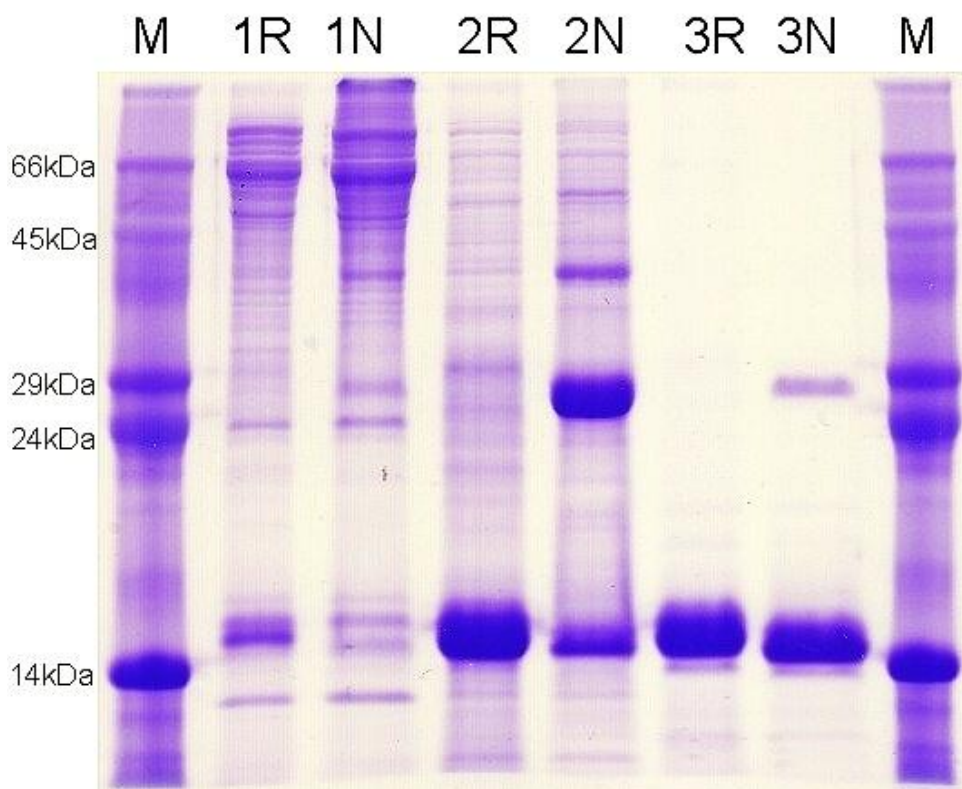


Obr. 11 Chromatogram bCD69 po velkoprodukci po gelové filtraci na koloně Superdex 75 HR 10/300 a průtoku mobilní fáze 0,4 ml/min o složení 15mM Tris, 150mM NaCl, 1 mM NaN_3 a pH 8,5

Eluát byl odebírán do oddělených frakcí:

1. frakce 23,4 – 28,3 min
2. frakce 28,3 - 35,5 min
3. frakce 35,5 – 42,5 min

Frakce byly zkoncentrovány a naneseny na SDS PAGE na Obr. 12, kde se separovaly v neredukujícím a redukujícím vzorkovém pufru s DTT. Protein se zde vyskytuje ve formě monomeru o velikosti přibližně 14,5 kDa a dimeru o velikosti přibližně 29 kDa.

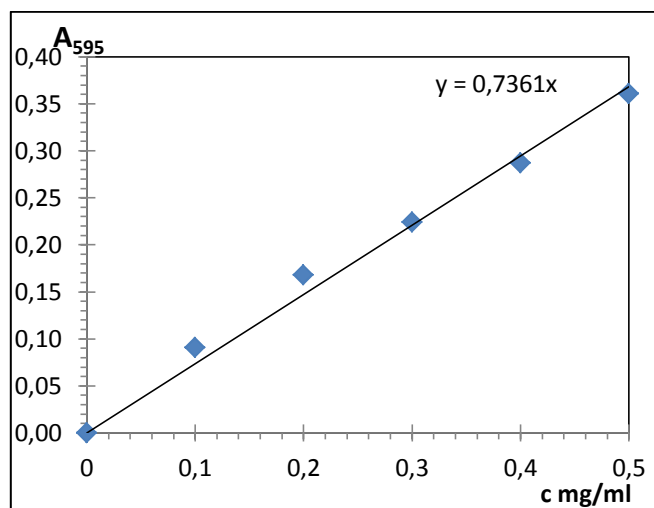


Obr. 12 Elektroforeogram bCD69 : 1-3 – jednotlivé frakce po gelové filtraci, M - standard molekulových hmotností, R – separace v redukujícím vzorkovém pufru, N separace v neredukujícím vzorkovém pufru

1. frakce 23,4 – 28,3 min
2. frakce 28,3 - 35,5 min
3. frakce 35,5 – 40,2 min

5.1.6 Stanovení koncentrace dle Bradfordové

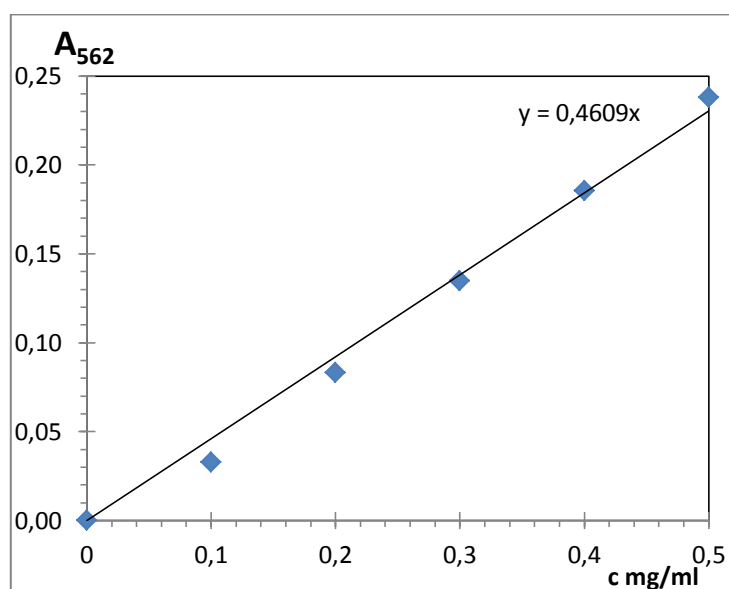
Stanovení koncentrace bylo provedeno dle protokolu 4.2.9.1 a na základě kalibrační křivky na Obr. 13 byla vypočítána koncentrace bCD69 o hodnotě 20,0 mg/ml, což při objemu vzorku 0,4 ml odpovídá zisku 8 mg. Pro ověření výsledku jsme koncentraci stanovovali ještě druhou přesnější metodou s použitím BCA.



Obr. 13 Stanovení koncentrace za použití činidla dle Bradfordové

5.1.7 Stanovení koncentrace za použití BCA

Stanovení bylo provedeno dle protokolu 4.2.9.2, a na základě kalibrační křivky na Obr. 14 byla stanovena koncentrace 21,8 mg/ml což odpovídá zisku 8,7 mg proteinu bCD69.

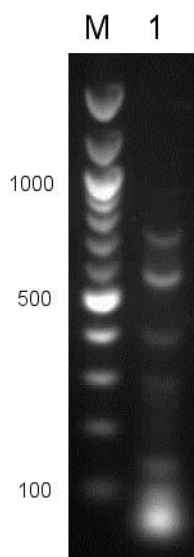


Obr. 14 Stanovení koncentrace za použití BCA

5.2 bNKR1

5.2.1 PCR

Oprava mutace DNA konstrukt bNKR1 probíhala dle protokolu 4.1.1 použitého i v mé bakalářské práci při přípravě konstrukt z cDNA. Byly použity původní oligonukleotidové sekvence pro přímý primer BOVNKRPF a pro zpětný primer BOVNKRPR. K reakci PCR byla nejprve použita Platinum Taq polymerasa, která zanechává v jednom vlákně DNA adenosinový přesah, který bylo potřeba další PCR s jinou polymerasou odstranit. Výsledek PCR s Platinum Taq analyzovaný agarosovou elektroforézou dle protokolu 4.1.3 na Obr. 15 ukazuje, že reakce neproběhla selektivně a místo jednoho čitelného proužku kolem 390 bp, který by odpovídal amplifikovanému inzertu, můžeme vidět více fragmentů po cca 100 bp. Produkt PCR byl podroben dalším PCR s Deep Vent a Pfu Turbo polymerasou, výsledek bohužel nedosahoval očekávaných výsledků.



Obr. 15 Produkt PCR s Platinum Taq polymerasou analyzovaný na agarosové elektroforéze
M - standard molekulových hmotností, 1 – produkt PCR

Programu termálního cyklátoru:

- 95 °C, 2min
- cyklus 35x
 - 95 °C, 30 s
 - 48 °C, 30 s
 - 72 °C, 45 s
- 72 °C, 6min

5.3 bNKG2D

5.3.1 Oligonukleotidově řízená mutagenese

Pro opravu mutace bNKG2D byla použita metoda PCR dle 4.1.2 a sestrojeny nové oligonukleotidové sekvence, tak aby oblast mutace byla uprostřed obou primerů. Byl navrhnut přímý primer bNKGmutfw a zpětný primer bNKGmutre, které byly navzájem komplementární a v antiparalerním uspořádání. K této reakci byla použita PFU Turbo polymerasa, která se vyznačuje vysokou přesností při amplifikaci DNA, frekvence chyb na počet bází je tak velmi malá. Program termocykleru byl upraven dle délky plazmidu a také na optimální podmínky PFU Turbo polymerasy viz následující program. Produkt PCR byl podroben restrikci endonukleasou DpnI dle 4.1.2 po dobu jedné hodiny, čímž se odstranila templátová DNA. Produkt byl následně zaslán na automatickou sekvenaci, kde bylo dokázáno, že mutace byla opravena.

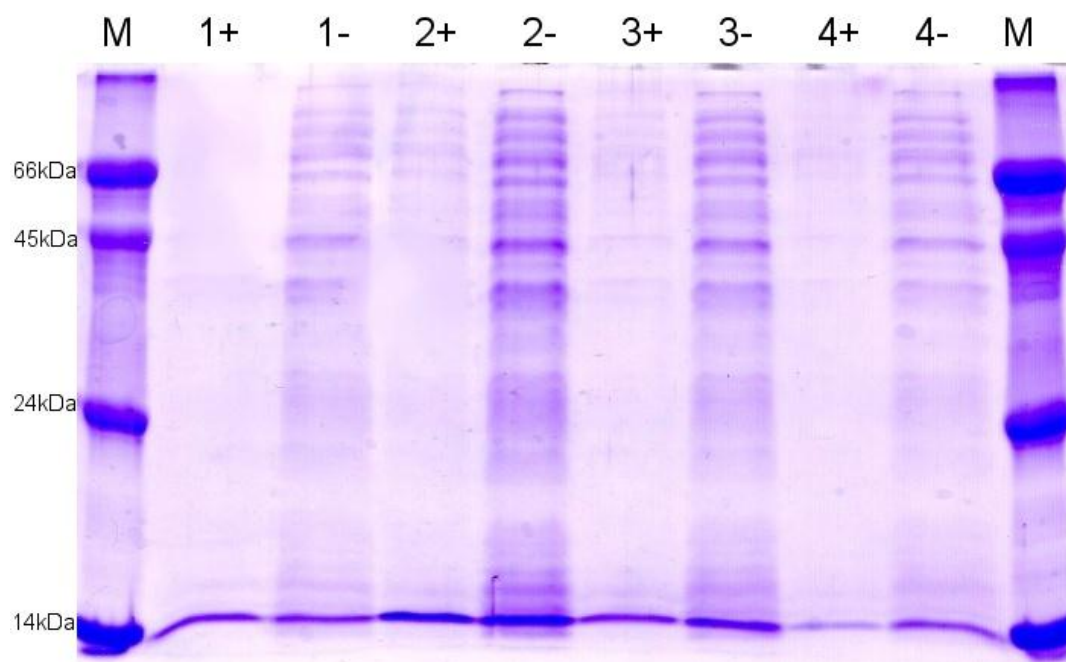
Pro PFU Turbo polymerasu byl použit program:

- 95 °C, 2 min
- cyklus 30x
 - 95°C, 45 s
 - 40°C, 45 s
 - 68°C, 8 min
- 68°C, 20 min

5.3.2 Produkce v bakteriálních buňkách

Protein bNKG2D zaligovaný v plazmidu pRSET B, jenž nese gen zodpovědný za rezistenci na ampicilin, byl transformován dle 4.2.1 do kompetentních buněk *E. coli* BL21-Gold(DE3). Po transformaci byla resuspendovaná peleta nanášena na Petriho misku s agarem a antibiotiky a nechána inkubovat 12 h při 37 °C. Vzniklo asi jedno sto viditelných bílých kolonií a čtyři z nich byly přeočkovány do 1 ml LB média s antibiotiky a kultivovány 3 h při 37 °C a 220 ot./min a dále dle protokolu 4.2.2 na selekci produkčního klonu.

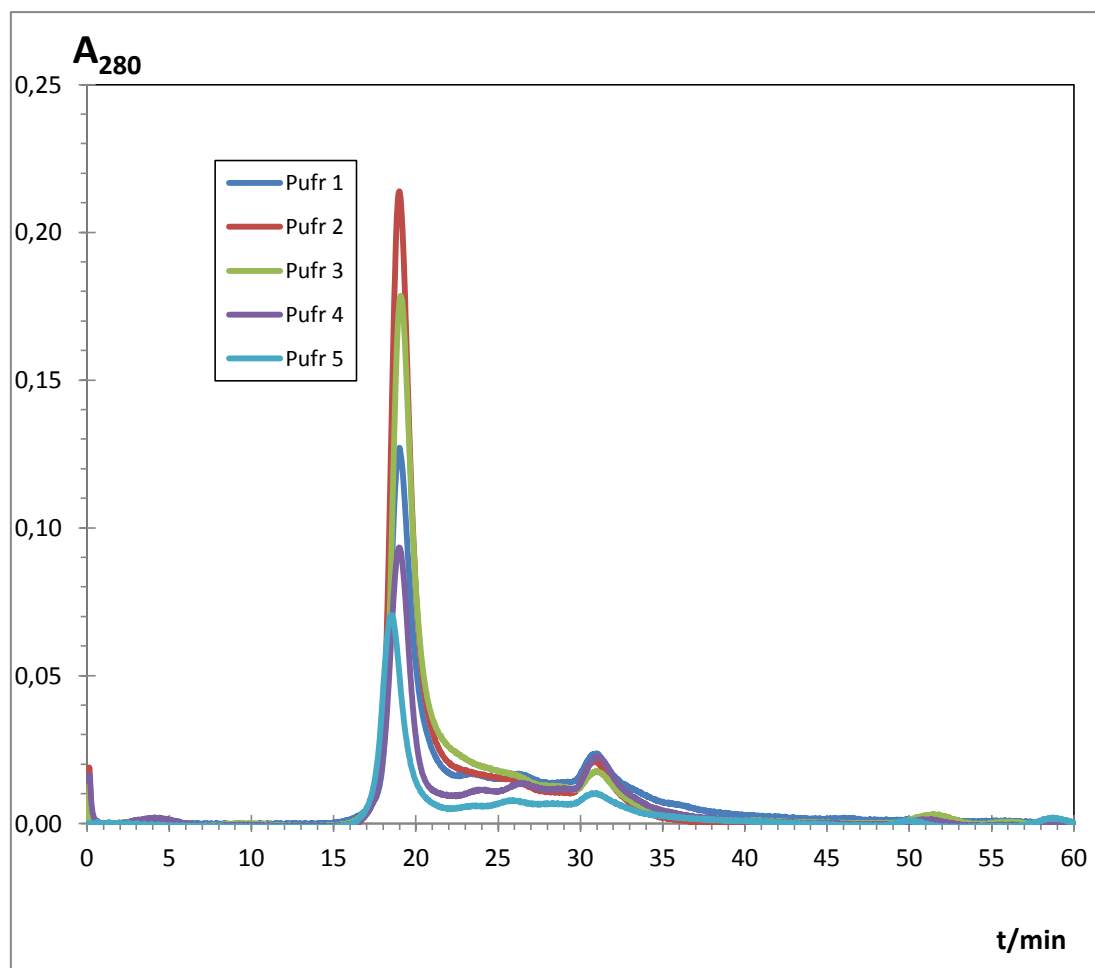
Expresce proteinu byla analyzována SDS PAGE, jejíž výsledek je na Obr. 16, kde můžeme vidět mírný relativní nárůst produkce proteinu o velikosti 14,5 kDa v indukovaných kulturách označených +, což odpovídá bNKG2D.



Obr. 16 Selekcce produkčního klonu bNKG2D: M marker; 1+, 2+, 3+, 4+ indukované kultury; 1-, 2-, 3-, 4- neindukované kultury

Po vybrání produkčního klonu byla provedena velkoobjemová produkce dle 4.2.5 v 500 ml LB média obsahujícího ampicilin a tetracyklin, bez přidání induktoru, jelikož rozdíl v produkci proteinu nebyl příliš rozdílný v indukovaných a neindukovaných kulturách.

Protein bNKR1 byl izolován, ale v průběhu renaturace a následné dialýzy docházelo k precipitaci a jak ukazuje Obr. 17, po nanesení na gelovou filtraci na kolonu Superdex 75 HR 10/300 se prokázalo velké množství agregátů a pouze malé množství renaturovaného proteinu bNKG2D. Retenční čas agregátů je kolem 19 min, monomerní formy je kolem 31 min.



Obr. 17 Chromatogram proteinu bNKR1 po gelové filtraci na koloně Superdex 75 HR 10/300 a průtoku mobilní fáze 0,4 ml/min o složení 15mM Tris, 150mM NaCl, 1 mM NaN₃ a pH 8,5

6 Diskuze

Tato diplomová práce navazuje na výsledky mé bakalářské práce a na mnohaleté zkušenosti členů laboratoře přirozené imunity, kde se pracuje s receptory NK buněk jiných organismů již několik let. Cílem bylo připravit rozpustné formy extracelulárních částí bovinních receptorů CD69, NKRP1 a NKG2D produkci v bakteriálních buňkách. Tento výzkumný záměr vznikl na základě spolupráce s Dr. Karlem Klischem z Institute of Animal Health, Velká Británie, který označil PSG (Pregnancy Specific Glykoprotein) jako možný fyziologický ligand těchto receptorů. Pro potvrzení této hypotézy je potřeba tyto proteiny naprodukovat, což bylo mým úkolem.

Výchozím materiálem byly konečné konstrukty z bakalářské práce, které byly vytvořeny ze vzorků sleziny získané na jatkách Jokoma ve Všetvicích. Tyto konstrukty byly zaslány na automatickou sekvenaci pro potvrzení správné sekvence DNA avšak u dvou ze tří konstruktů (bNKRP1 a bNKG2D) byla nalezena jednobodová mutace DNA.

U konstruktů bNKRP1 byla mutace v DNA v třetím nukleotidu před Stop kodonem, což by mělo za následek změnu aminokyselinové sekvence proteinu, kdy by došlo k náhradě poslední aminokyseliny lysin₁₂₄ za glutamin₁₂₄. Oprava tedy byla žádoucí, a jelikož mutovaný nukleotid je součástí primeru pro PCR, byla použita metoda PCR, s kterou jsem pracovala již v rámci bakalářské práce. Použila jsem stejné polymerasy a teplotní program jako v bakalářské práci, jelikož se mi tento postup osvědčil. V diplomové práci bohužel výsledky metody nebyly vyhovující, což mohlo mít několik příčin, které bylo potřeba zjistit. Bylo prověřeno ředění výchozích látek, správná funkčnost polymerasy, ověření, že templát nebyl v průběhu skladování degradován, několikrát byl optimalizován teplotní program reakce, bylo vyzkoušeno několik druhů polymeras, ale stále nevznikal správný konečný produkt. Podařilo se získat pouze meziprodukt po PCR s Platinum Taq polymerasou, který však obsahuje adenosinový přesah na jednom vlákně DNA. Tento přesah neumožňuje ligaci do standardně používaného klonovacího vektoru pBSSK+. Další PCR např. s Deep Vent nebo Pfu Turbo polymerasou, která amplifikuje vlákno bez přesahů, se však produktu nepodařilo dosáhnout ani po úpravách teplotního programu. Důvodem neúspěchu tedy mohla být

např. kontaminace výchozích látek, pravděpodobně primerů, nebo špatná lokalizace mutace DNA neumožnila selektivní nasednutí primerů a tím amplifikaci pouze jednoho vlákna. V případě kontaminace primerů, by bylo vhodné objednat nově připravené primery o stejné sekvenci anebo vyzkoušet metodu použitou u bNKG2D oligonukleotidově cílené mutagenese, kdy by byly navrženy primery nové, obě možnosti by ale zvyšovaly finanční náročnost pokusu, a proto byly navržené postupy prozatím odloženy.

U konstruktu bNKG2D byla změna DNA zhruba v 1/3 nukleotidového řetězce, což by později v aminokyselinové sekvenci proteinu znamenalo výměnu tyrosinu₄₇ za histidin₄₇. Oprava konstruktů probíhala specifickým typem PCR „oligonukleotidově řízenou mutagenesí“. Pro tento typ PCR bylo potřeba navrhnout nové primery přes bod mutace, použít velmi přesnou Pfu Turbo polymerasu, upravit teplotní program PCR a produkt reakce podrobit působení endonukleasy DpnI.

Tento postup se ukázal jako správný, což bylo ověřeno na automatickém sekvenátoru, kdy mutace byla opravena a konstrukt bNKG2D mohl být vnesen do produkčního bakteriálního systému *E. coli* BL21-Gold(DE3). Bakteriální produkce byla zvolena na základě dlouhodobých zkušeností laboratoře s tímto systémem kvůli nízkým provozním nákladům a velkým výtěžkům exprimovaných proteinů. Mezi možné nevýhody lze zahrnout absenci posttranslačních úprav proteinů (zejména glykosylaci, což může zabraňovat správnému prostorovému uspořádání a komplikovat průběh renaturace tvorbou agregátů) a produkci proteinu v nerozpustné formě inkluzních tělísek. Produkce probíhala bez problému s dostatečným množstvím proteinu, v indukovaných i neindukovaných buňkách. Tato skutečnost je daná tím, že DNA inzert byl v expresním vektoru pRSET B, u něhož je po přidání induktoru IPTG snížena produkce bakteriálních proteinů, ale exprese klonovaného proteinu se příliš nezvýší, na rozdíl od pET30(a)+. U velkoobjemové produkce bylo tedy výhodné kulturu ponechat bez indukce, čímž se snížila obtížnost produkce a také celkové náklady na výrobu proteinu. Po selekci a namnožení produkčního klonu se přistoupilo k renaturaci. Bylo vyzkoušeno pět renaturačních pufrů s různým poměrem účinných látek, které jsou

v laboratoři dlouhodobě odzkoušeny a poskytují dobré výsledky. Žádný z nich však příliš nepomohl správnému strukturnímu uspořádání proteinu, což odpovídá zkušenostem pracovníku laboratoře s jeho ortologem lidským NKG2D. Protein byl v průběhu renaturace a dialýzy částečně vysrážen a při gelové filtraci na koloně Superdex 75 HR 10/300 byl prokázán vznik velkého množství agregátů a malého zisku správně renaturovaného proteinu bNKG2D. Po zopakování pokusu bylo renaturovaného proteinu naprodukováno dostatečné množství na případné vazebné experimenty nebo analýzu hmotnostní spektrometrií.

Největší pozornost jsem tedy soustředila na konstrukt pro protein bCD69. Byl v bakalářské práci připraven jako jediný bez mutací, a tak se mohlo ihned přistoupit k produkci v bakteriálním systému *E. coli* BL21-Gold(DE3). Produkce probíhala bez problému s dostatečnou tvorbou proteinu. Při renaturaci bCD69 vyhovovalo hned několik podmínek a jako nejlepší byl zvolen renaturační pufr 1, který dosahoval společně s pufr 2 velmi obdobných výtěžků. Pufr 1 obsahoval pouze 0,4 M arginin oproti 1 M argininu v pufru 2, a proto byl kvůli nižší spotřebě chemikálií upřednostněn.

Vybrané složení renaturačního pufru 1 bylo použito na konečnou velkoprodukci proteinu. Při optimalizaci produkce bCD69 byly optimalizovanými parametry čas produkce proteinu po přidání induktoru IPTG a koncentrace tohoto induktoru. Nejlepší produkce byla dosažena v čase 3 h, kdy se protein nejvíce produkoval a ještě nebyl degradován. U optimalizace koncentrace IPTG byla jako nejvhodnější podmínka zvolena 0,1 mM koncentrace IPTG ve vzorku, kdy byl největší zisk proteinu a nejmenší spotřeba induktoru. Tyto podmínky byly použity u velkoobjemové produkce proteinu, následovala dialýza v 8 l dialyzačního pufru a gelová filtraci na koloně Superdex 75 HR 10/300 s mobilní fází o stejném složení jako dialyzační pufr. Bylo získáno z 500 ml LB média 8,7 mg bCD69, což je ve srovnání s jinými proteiny produkovány v naší laboratoři velmi slušný výtěžek. Stanovení proteinu bylo provedeno metodou s BCA.

Na SDS PAGE v redukujícím a neredukujícím vzorkovém pufru (Obr. 11) je ve drahách třetí frakce kolem 14,5 kDa vidět posun mobility v neredukujícím prostředí, což naznačuje zapojení disulfidů, čímž se molekula stává kompaktnější a pohybuje se

v gelu rychleji. Zároveň je vidět část proteinu ve formě dimeru o velikosti 29 kDa, a tak by mělo být předmětem dalších experimentů pokusit se analyzovat zapojení disulfidických můstků pomocí hmotnostní spektrometrie.

Tato skutečnost bude tedy předmětem dalšího zkoumání, stejně jako hledání fyziologického ligandu, strukturní experimenty, produkce izotopově značeného proteinu na NMR analýzu nebo krystalizace proteinu pro rentgenovou difrakci.

Experimenty a nové poznatky o NK buňkách a jejich receptorech mohou být nápomocny v klinických studiích, jejichž předmětem je nádorové bujení, orgánová transplantace, HIV a jiná autoimunitní onemocnění či úspěšnost reprodukce. Výsledky experimentů s bovinními receptory NK buněk mohou být uplatněny ve veterinární medicíně.

Získala jsem unikátní výsledky s bovinním CD69, který se při renaturaci pravděpodobně uspořádal současně jako monomerní i dimerní protein. Takové vlastnosti, nebyly u ostatních NK receptorů skládaných v laboratoři přirozené imunity pozorovány, neboť se vždy uspořádaly buď jako monomer nebo jako dimer. Na potvrzení této hypotézy by, ale bylo potřeba provést mapování disulfidů hmotnostní spektrometrií a pokusit se úplně oddělit monomerní od dimerní formy proteinu. Pokud by se hypotéza potvrdila, by bylo možné v dalších studiích využít bovinní CD69 jako unikátní modelový protein umožňující lépe pochopit molekulární mechanismy renaturace NK receptorů do formy monomerních nebo naopak dimerních proteinů.

7 Citovaná literatura

- [1] **Hořejší, V.; Bartůňková, J.:** *Základy imunologie*. 4. vyd. Praha, Triton (2009).
- [2] **Trinchieri, G.:** *Adv. Immunol.* 47, 187 (1989).
- [3] **Lexová, S. a kol.:** *Hematologie pro zdravotní laboranty*. Brno, Institut pro další vzdělávání pracovníků ve zdravotnictví (2000).
- [4] **Goldsby, R. A.; Kindt, T. J.; Osborne, B. A.:** *Kuby imunology*. 6. vyd. New York, W.H. Freeman & Company (2006).
- [5] **Department of Health and Human Services:** Bone Marrow (Hematopoietic) Stem Cells. *Regenerative Medicine* (2006).
<<http://stemcells.nih.gov/info/scireport/2006report.htm>>, [cit. 13.5.2012].
- [6] **Moretta, A.; Bottino, C.; Mingari, M.; Biassoni, R.; Morreta, L.:** *Nat. Immunol.* 1, 6 (2002).
- [7] **Raulet, D. H.:** *Nat. Immunol.* 5, 187 (2004).
- [8] **Janeway, C. A.; Travers, P.; Walport, M.; Shlomchik, M. J.:** *Immunobiology*. New York, Garland Science, (2005).
- [9] **Kiessling, R.; Klein, E.; Wigzell, H.:** *Eur. J. Immunol.* 5, 112 (1975).
- [10] **Lisnić, V. J.; Krmpotić, A.; Jonjić, S.:** *Curr. Opin. Microbiol.* 4, 530 (2010)
- [11] **Robertson, M. J.; Ritz, J.:** *Blood*. 76, 2421 (1990).
- [12] **Grégoire, C.; Chasson, L.; Luci, C.; Tomasello, E.; Grossmann, F.:** *Immunol. Rev.* 220, 169 (2007).
- [13] **Trinchieri, G.:** *Advances in immunology*. 47, 187 (1989).
- [14] **Lanier, L. L.:** *Nat. Immunol.* 9, 495 (2008).
- [15] **Yokoyama, W.:** *Nat. Immunol.* 9, 481 (2008).
- [16] **Lanier, L. L.:** *Annu. Rev. Immunol.* 23, 225 (2005).

- [17] **Ljunggren, H. C.; Karre, K.:** *Immunol. Today*. 11, 237 (1990).
- [18] **Raulet, D. H.; Vance, R. E.; McMahon, C. W.:** *Annu. Rev. Immunol.* 19, 520 (2001).
- [19] **Moretta, A.; Bottino, C.; Vitale, M.; Pende, D. Cantoni, C.:** *Annu. Rev. Immunol.* 19, 197 (2001).
- [20] **Medzhitov, R.; Janeway, C. A.:** *Science* 296, 298 (2002).
- [21] **Raulet, D. H., Vance, R. E.:** *Nat. Rev. Immunol.* 6, 520 (2006).
- [22] **Oldenborg, P. A.; Zheleznyak, A.; Fang, Y. F.; Lagenaur, C. F.; Greshman, H. D.:** *Science*. 288, 2051
- [23] **Walzer, T.; Walter, T.; Bléry, M.; Chaix, J.; Fuseri, N.:** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 104, 3384 (2007).
- [24] **Podack, E. R.; Young, J. D.; Cohn, Z. A.:** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 82, 8629 (1985).
- [25] **Long, E. O.:** *Immunity*. 26, 38 (2007).
- [26] **Trinchieri, G.:** *Nat. Rev. Immunol.* 3, 133 (2003).
- [27] **Borg, C.; Terme, M.; Taieb, J.; Menard, C.; Flament, C.:** *J. Clin. Invest.* 114, 379 (2004)
- [28] **Tschopp, J.; Massom, D.; Stanley, K. K.:** *Nature*. 322, 831 (1986).
- [29] **Shi, L.; Kraut, R. P.; Aebersold, R.; Greenberg, A. H. A.:** *J. Exp. Med.* 175, 553 (1992).
- [30] **Orange, J. S.:** *Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol.* 6, 399 (2006).
- [31] **Imai, K.; Matsuyama, S.; Miyake, S.; Suga, K.; Nakachi, K.:** *Lancet*. 356, 1795 (2000).
- [32] **Vivier, E.; Nunes, J. A; Vely, F.:** *Science*. 306, 1517 (2004).
- [33] **Anderson, P.; Caligiuri, M., Ritz, J.; Schlossman, S. F.:** *Nature*. 341, 159 (1989).

- [34] **Hibbs, M. L.; Selvaraj, P.; Carpen, O.; Springer, T. A.; Kuster, H.:** *Science*. 246, 1608 (1989).
- [35] **Lanier, L. L.; Corliss, B.; Wu, J.; Phillips, J. H.:** *Immunity*. 8, 693 (1998).
- [36] **Reth, M.:** *Nature*. 338, 383 (1989).
- [37] **Barten, R.; Torkar, M., Haude, A., Trowsdale, J., Wilson, J. M.:** *Trends Immunol.* 22, 52 (2001).
- [38] **Jevremovic, D., Billadeau, D. D.; Schoon, R. A.; Dick, C. J.; Irvin, B. J.:** *J. Immunol.* 162, 2453 (1999).
- [39] **Wange, R.L.:** *Sci. STKE*. 2000, rel (2000).
- [40] **Jiang, K.; Zhong, B.; Gilvary, D. L.; Corliss, B. C.; Hong-Geller, E.:** *Nat. Immunol.* 1, 419 (2000).
- [41] **Billadeau, D. D.; Upshaw, J. L.; Schoon, R. A.; Dick, C. J.; Leibson, P. J.:** *Nat. Immunol.* 4, 509 (2003).
- [42] **Bix, M.; Liao, N. S.; Zijlstra, M.; Loring, J.; Jaenisch, R.:** *Nature*. 349, 329 (1991).
- [43] **Vély, F.; Vivier, E.:** *J. Immunol.* 159, 2075 (1997).
- [44] **Long, E. O.:** *Annu. Rev. Immunol.* 17, 875 (1999).
- [45] **Stebbins, C. C.; Watzl, C.; Billadeau, D. D.; Leibson, P. J.; Burshtyn, D. N.:** *Mol. Cell. Biol.* 23, 6291 (2003).
- [46] **Binstadt, B. A.; Billadeau, D. D.; Jevremovic, D.; Williams, B. L., Fang, N.:** *J. Biol. Chem.* 273, 27518 (1998).
- [47] **Valiante, N. M.; Phillips, J. H.; Lanier, L. L.; Parham, P.:** *J. Exp. Med.* 184, 2243 (1996).

- [48] **Graham, E. M., Thom, M. L.; Howard, C. J.; Boysen, P.; Storset, A. K.; Sopp, P.; Hope, J. C.:** *Vet. Res.* 132, 101 (2009).
- [49] **Elhmouzi-Younes, J.; Storset, A. K.; Boysen, P.; Laurent, F.; Drouet, F.:** *Vet. Res.* 40, 54 (2009).
- [50] **Storset, A., K.; Slettedal, I. O.; Williams, J. L.; Law, A.; Dissen, E.:** *Eur. J. Immunol.* 33, 980 (2003).
- [51] **Govaerts, M. M.; Goddeeris, B. M.:** *Vet. Immunol. Immunopathol.* 80, 339 (2001).
- [52] **McQuen, K., L.; Wilhelm, B. T.; Harden, K. D.; Mager, D. L.:** *Eur. J. Immunol.* 32, 810 (2002).
- [53] **Ahn, J. S.; Hamilton, M. J.; Davis, W. C.; Park, Y. H.:** *Vet. Immunol. Immunopathol.* 88, 43 (2002).
- [54] **Ryan, J. C.; Niemi, E. C.; Nakamura, M. C.; Seaman, W. E.:** *J. Exp. Med.* 181, 1911 (1995).
- [55] **Fikri, Y.; Nyabenda, J.; Content, J.; Huygen, K.:** *Immunogenetics.* 59, 653 (2007).
- [56] **Stratagene:** Instruction Manual, *QuickChange Site-Directed Mutagenesis Kit* (2005).

Přílohy

bNKR1

```
Query 1 CATATGTTAACGTGTCCAATGCACTGGAAACGAATCCGAGATAAATGCTTATATTTTAGT 60
      |||
Sbjct 1 CATATGTTAACGTGTCCAATGCACTGGAAACGAATCCGAGATAAATGCTTATATTTTAGT 60

Query 61 GAAACTTCCAAACCTTGGAATGATAGTCTAGCTGACTGTTCCACAAGAGAATCCAGTCTA 120
      |||
Sbjct 61 GAAACTTCCAAACCTTGGAATGATAGTCTAGCTGACTGTTCCACAAGAGAATCCAGTCTA 120

Query 121 CTGCTTATTCAAGATCAGGAAGAATTGAGACTCATGCAAAACCTGATAAACAAAGAAGGA 180
      |||
Sbjct 121 CTGCTTATTCAAGATCAGGAAGAATTGAGACTCATGCAAAACCTGATAAACAAAGAAGGA 180

Query 181 ATTCTGTTTTGGATTGGATTAAATTTTACATTATCAGGGAAGAGCTGGAAGTGGATAAAT 240
      |||
Sbjct 181 ATTCTGTTTTGGATTGGATTAAATTTTACATTATCAGGGAAGAGCTGGAAGTGGATAAAT 240

Query 241 GGTTCCCTTTTAAATCTAATATATTACCCATTTTGGTGATGCTAAAGAAGACTGCTGT 300
      |||
Sbjct 241 GGTTCCCTTTTAAATCTAATATATTACCCATTTTGGTGATGCTAAAGAAGACTGCTGT 300

Query 301 GTTTACATATCAAAGACACAATGTATTTCTGATTACTGTGCTGCAAAAAATAGATGGATC 360
      |||
Sbjct 301 GTTTACATATCAAAGACACAATGTATTTCTGATTACTGTGCTGCAAAAAATAGATGGATC 360

Query 361 TGCCAAAAGGAAGTGAAGTAAGCTT 385
      |||
Sbjct 361 TGCCAAAAGGAAGTGAAGTAAGCTT 385
```

Příloha 1 Nukleotidová sekvence **bNKR1** se žlutě označeným místem mutace

bNKG2D

```
Query 1 CATATGTTGAAAGAAAATTACTGTGGTCCATGTCCTAAAACTGGATATGTTATAGAAAT 60
      ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct 44 CATATGTTGAAAGAAAATTACTGTGGTCCATGTCCTAAAACTGGATATGTTATAGAAAT 103

Query 61 AACTGCTACCAATTTTAAATGAGAGCAAAAGCTGGCACCAGAGCCAAGCTTCTTGATG 120
      ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct 104 AACTGCTACCAATTTTAAATGAGAGCAAAAGCTGGCACCAGAGCCAAGCTTCTTGATG 163

Query 121 TCTCAAATTCAGTCTCCTGAAGATATACAGCAAAGATGACCAGGATTCCTTAAATTG 180
      ||||||||||||||||||||| ||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct 164 TCTCAAATTCAGTCTCCTGAAGATACACAGCAAAGATGACCAGGATTCCTTAAATTG 223

Query 181 GTGAAGTCATATCATTGGATGGGACTAGTACAAGTTCCACAAATGGTTCCTGGCAATGG 240
      ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct 224 GTGAAGTCATATCATTGGATGGGACTAGTACAAGTTCCACAAATGGTTCCTGGCAATGG 283

Query 241 GAAGATGGCTCCATTCTCTTGCCCAACCTACTAACAATGGTTGAAATGCAGAATGGAACC 300
      ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct 284 GAAGATGGCTCCATTCTCTTGCCCAACCTACTAACAATGGTTGAAATGCAGAATGGAACC 343

Query 301 TGTGCAGTCTATGGCTCAAGTTTTAAAGCTTATACAGAAAATTGCTTAACTCCAAACACA 360
      ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct 344 TGTGCAGTCTATGGCTCAAGTTTTAAAGCTTATACAGAAAATTGCTTAACTCCAAACACA 403

Query 361 TACATCTGCATGCAGAGAATTGTGTAAGCTT 391
      ||||||||||||||||||||
Sbjct 404 TACATCTGCATGCAGAGAATTGTGTAAGCTT 434
```

Příloha 2 Nukleotidová sekvence bNKG2D se žlutě označeným místem mutace